Der lipophile Inhaltsstoff von Muira puama

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Birgit Momberger, geb. Wagler

aus Gießen

1971

1970

Der lipophile Inhaltsstoff von Muira puama

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Pharmazie

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Birgit Momberger, geb. Wagler

aus Gießen

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 1970

Dekan: Professor Dr. H. Auterhoff
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Graf

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Meinem Vater
Friedrich Pascoe
in Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1969 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Oktober 1970 abgeschlossen.

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. H. Auterhoff,

danke ich für die Anregungen und die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

1. Isolierung der Substanz c 3

2. Vergleich von Substanz c mit Lupeol 6
   2.1. Gewinnung von Lupeol aus Bresk 7
   2.2. Derivate von Substanz c und Lupeol 9
   2.3. Farbreaktionen 11
   2.4. IR-Spektren 12
   2.5. NMR-Spektren 17
   2.6. Massenspektren 22

3. Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Lupeol in Muira puama 26
   3.1. Vergleich verschiedener Farbreaktionen 26
   3.2. Bestimmung von Lupeol mit der Chlorsulfonsäurereaktion 28
   3.3. Bestimmung von Lupeol in Muira puama 33
   3.4. Bestimmung des Lupeolgehaltes in verschiedenen Drogenmustern und Zubereitungen von Muira puama 41

4. Quantitative Bestimmung von ß-Sitosterin in Muira puama mit der Liebermann-Burchard-Reaktion . . . 43
   4.1. Bestimmung des ß-Sitosteringehaltes in verschiedenen Drogenmustern und Zubereitungen von Muira puama 47
   4.2. Übersicht über den Lupeol- und ß-Sitosteringehalt 49

5. Untersuchung von in Muira puama vorhandenen Pilzen auf ihren Lupeolgehalt 50

6. Mikroskopischer und mikrochemischer Vergleich einer lupeolreichen mit einer lupeolarmen Droge 53

Zusammenfassung 56

Beschreibung der Versuche 59

Einleitung

Die in Südamerika beheimatete Droge Lignum Muira puama wurde in Europa Ende des 19. Jhts. eingeführt. Als Stammpflanzen werden nach den ausführlichen Untersuchungen von ANSELMINO 1) Ptychopetalum olacoides Bentham und Ptychopetalum uncinatum Anselmino aus der Familie der Olacaceae (Santalales) genannt. Arzneiliche Verwendung finden das Holz und die Rinde der Stämme und Wurzeln.

Offizinell sind nach dem Ergänzungsbuch zum DAB 6 Lignum Muira puama und Extractum Muira puama fluidum (Arzneigehalt 1 : 1). Im HAB wird aus dem getrockneten Holz und der Wurzelrinde eine Tinktur mit 90 %igem Weingeist hergestellt (Arzneigehalt 1/10). In der brasilianischen Pharmakopoë werden Extractum Muira puama (Spissumextrakt), Extractum Muira puama fluidum und Tinctura Muira puama aufgeführt.
Im Gegensatz zum Ergänzungsbuch und HAB, die für die Zubereitungen das Holz der Stämme und die Wurzeln verwenden lassen, werden in den brasilianischen Vorschriften für die Tinktur und den Fluidextrakt nur die getrockneten Wurzeln verarbeitet, die dort auch den Namen "Marapuama" tragen.

Lignum Muira puama ist auch heute noch in Form des alkoholischen Trockenextraktes in neueren Arzneimitteln, die als Aphrodisiaca verwendet werden, zu finden. Die Anwendung erfolgt meist in Kombination mit androgenen Hormonen oder Testisextrakten, Lecithin, Glutaminsäure und Vitaminen.

Angaben über Inhaltsstoffe von Muira puama waren schon Anfang des 20. Jhts. von REBOURGEON [2] und PECKOLT [3] veröffentlicht

---

1) E. ANSELMINO, Arch. Pharmaz. 271, 296 (1933).
2) M. REBOURGEON, Journal de Pharmacie et de Chimie II, 430 (1893).
3) T. PECKOLT, Ber. dtsch. Pharm. Ges. 11, 43 (1901).

worden. REBOURGEON gab ätherisches Öl, eine kristallisierende Substanz (die er für ein Glykosid und das wirksame Prinzip der Droge hielt), Gerbstoff, Phlobaphen und indifferente Stoffe an. PECKOLT fand dagegen weder Gerbstoff noch ätherisches Öl, sondern Fett (0,4 %), α - und ß- Harzsäure (0,6 und 0,7 %), einen amorphen Bitterstoff (0,5 %), eine stark styptisch schmeckende Substanz (0,1 %) und eine kristalline Substanz, die er als "Muyrapuamin" bezeichnete (0,05 %).

In der Dissertation PANKOW [4] sind erneut die Inhaltsstoffe von Muira puama untersucht worden, die lipophiler Natur waren. Dabei wurden als Hauptinhaltsstoffe des Petrolätherextraktes eine Estersubstanz e, ß- Sitosterin und ein als "Substanz c" bezeichnetes steroidähnliches Produkt gefunden. ß- Sitosterin war, bezogen auf die Droge, zu 0,005 %, die Estersubstanz zu 0,1 % und Substanz c zu 0,04 % enthalten. Die durch Umkristallisieren des Petrolätherextraktes mit Äther erhaltene Estersubstanz erwies sich nach alkalischer Verseifung in unreiner Form als ein Gemisch von ß- Sitosterin und Substanz c, bestand aber in reiner Form nur aus Substanz c. Die Säurekomponente wurde als ein Gemisch aus 61,3 % Behensäure und 38,7 % homologen Fettsäuren identifiziert. Für Substanz c wurde eine Formel vorgeschlagen, 20-Methyl-8,15-sitostadien-3α-ol, aber noch nicht sicher bewiesen.

Substanz c, die nach REBOURGEON in veresterter Form das Wirkprinzip der Droge darstellen soll, wollten wir daher noch genauer untersuchen.

---

4) E. PANKOW, Dissertation Tübingen (1968).
H. AUTERHOFF u. E. PANKOW, Arch. Pharmaz. 301, 481 (1968).

Auf Grund einer modifizierten Isolierungsmethode mußten wir annehmen, daß es sich bei dem von H. AUTERHOFF und E. PANKOW gewonnenen Produkt noch um ein Gemisch gehandelt hatte, da sich der Schmelzpunkt der von uns hergestellten Substanz mit 213 - 215° wesentlich von der zuerst gewonnenen Substanz c mit dem Schmelzpunkt von 189 - 191° unterschied.

1. Isolierung von Substanz c

Die grob gepulverte Droge wurde 14 Tage permanent in einer Soxhletapparatur mit Petroläther (50 - 70°) extrahiert. Nach

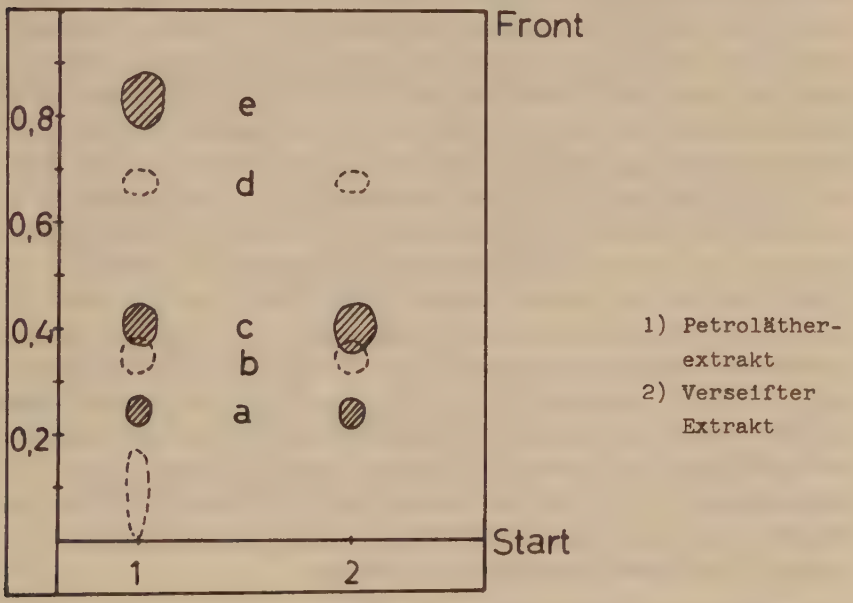


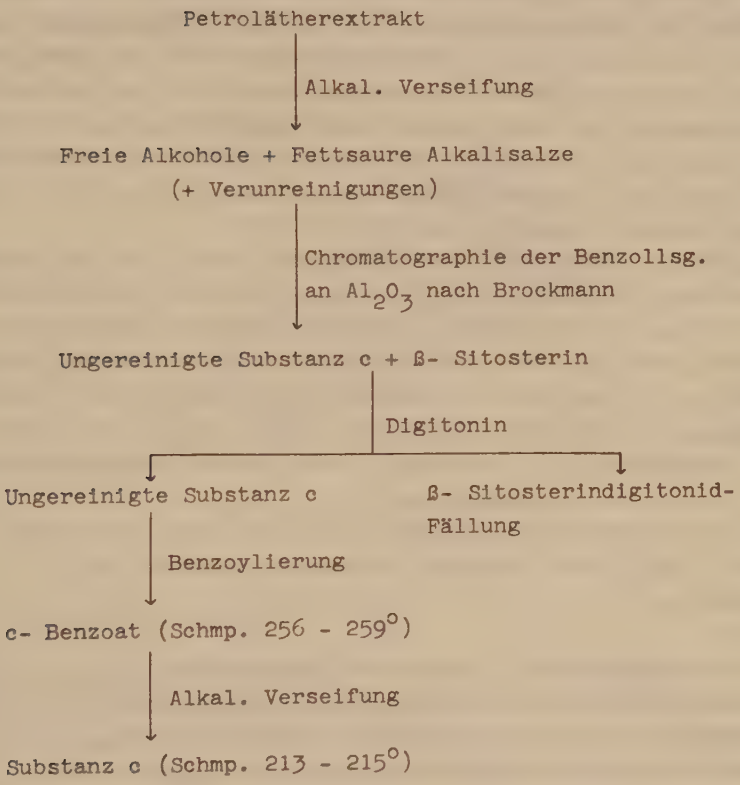
Abb. 1: Schematisches Dünnschichtchromatogramm des Petrolätherextraktes und des verseiften Petrolätherextraktes mit Kieselgel HF 254 "Merck" als Adsorbens und Benzol/Aceton (95,5 : 4,5) als Fließmittel.

der Aufarbeitung erhielten wir eine gelbgrüne bis gelbbraune Substanz von öliger Konsistenz, deren Menge je nach Herkunft der Droge zwischen 0,1 - 0,6 % der Droge schwankte.

Das Dünnschichtchromatogramm des Petrolätherextraktes stimmte mit dem der Arbeit PANKOW[4] überein. Der in der Abb. 1 als Substanz a bezeichnete Stoff wurde als ß- Sitosterin identifiziert.

Um auch die in freier Form vorliegende Substanz c zu erfassen, verseiften wir ohne vorherige Umkristallisation längere Zeit den gesamten Petrolätherextrakt mit äthanolischer Kalilauge in der Siedehitze unter ständigem Rühren. Die alkoholische Lösung wurde fast völlig eingedampft, der Rückstand in Benzol gelöst und zur Reinigung über eine kurze Säule von neutralem Aluminiumoxid nach Brockmann unter Elution mit Benzol chromatographiert. Nach Abdampfen des Benzols ließ sich ß- Sitosterin aus alkoholischer Lösung als Digitonid entfernen. Der Rückstand des Alkohols wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherextrakt bestand zwar vorwiegend aus Substanz c; es konnte jedoch durch Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln (Benzol, Äther, Essigester, Aceton, Methanol) Substanz c nicht dünnschichtchromatographisch rein erhalten werden. Daher benzoylierten wir den gesamten Rückstand nach Lösung in Benzol mit Benzoylchlorid in Gegenwart von Pyridin. Aus dem gut kristallisierenden Benzoat konnten die Verunreinigungen leicht durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton entfernt werden. Nach mehrstündigem Verseifen des gereinigten Benzoates erhielten wir Substanz c, die sich nach Umkristallisation aus Methanol als dünnschichtchromatographisch rein erwies.

Aufarbeitungsschema des Extraktes



2. Vergleich von Substanz c mit Lupeol

Zur Vororientierung führten wir zunächst mehrere Farbreaktionen durch. Die Salkowski-Reaktion auf Steroide fiel wie bei 4) negativ aus, ebenso die Liebermann-Burchard-Reaktion (LBR). Während das von PANKOW[4] isolierte Produkt bei der letzteren Farbreaktion nur eine unspezifische Braunfärbung gab, entstand mit der erneut isolierten Verbindung langsam eine Rotfärbung, die erst nach längerem Stehen in gelb überging, was aber auch einen negativen Ausfall der LBR bedeutete.
Wir führten daher noch 2 Farbreaktionen durch, die zur Unterscheidung von Sterinen und Triterpenen benutzt werden können:
1.) Mit 2,6-Di-tert. butyl-p-kresol in äthanolischer Lösung bilden pentacyclische Triterpene eine violette Färbung, während Sterine sich nur gelb bis grün färben sollen. Die mit reiner Substanz c ausgeführte Farbreaktion fiel positiv aus. Bei der zum Vergleich mit ß- Sitosterin ausgeführten Reaktion entstand nur eine schwache Gelbfärbung[5].
2.) Mit Chlorsulfonsäure/Eisessig-Reagens wies die mit Substanz c gebildete intensive Rotfärbung ebenfalls auf ein Triterpen hin[6].

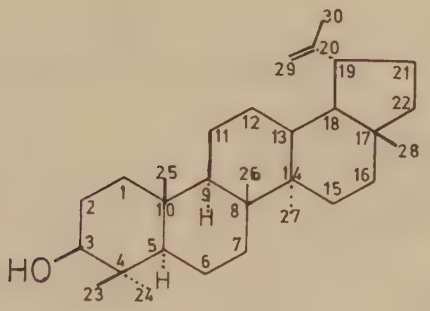
Nach H. BUDZIKIEWICZ[7] hätte das Massenspektrum der von PANKOW vorgeschlagenen Steroidformel ein intensives Fragment entsprechend dem Verlust der Seitenkette aufweisen müssen, das aber nicht auftrat. Das Fragmentierungsmuster entsprach eher einem Triterpen und ähnelte dem von Lupenon.

Alle diese Befunde wiesen eher auf ein pentacyclisches Triterpen als auf ein Steroid hin. Beim Vergleich der Schmelzpunkte der

---

5) C.H. BRIESKORN u. G.H. MAHRAN, Naturwissenschaften 47, 107 (1960).
6) C.H. BRIESKORN u. M. BRINER, Pharmac. Acta Helvetiae 28, 139 (1953).
7) H. BUDZIKIEWICZ, J.M. WILSON u. C. DJERASSI, J. Amer. chem. Soc. 85, 3688 (1963).

Substanz c und c- Benzoat mit pentacyclischen Triterpenen, stimmten diese mit denen von Lupeol und Lupeolbenzoat überein. Deshalb wurde Substanz c bei allen weiteren Untersuchungen mit Lupeol verglichen, das aus einer anderen Droge erst isoliert werden mußte.



Lupeol (Lup-20(29)en-3ß-ol)

2.1. Gewinnung von Lupeol aus Bresk

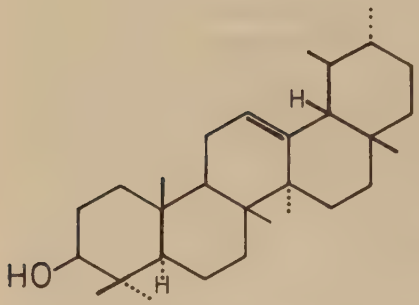
Als Ausgangsdroge wurde Bresk,[x)] der auch unter dem Namen Gutta-Gelutong im Handel ist (Synonyma: Gutta Pontianak, Gummi-Gelutong, Dead Borneo) gewählt, da sie neben α- und ß-Amyrin mindestens 20 % Lupeol in veresterter Form enthält. Die Amyrine und Lupeol sind isomer. Bresk ist das Latex-Coagulum von Dyera costulata Hook[8)] (Apocynaceae), das durch Aufritzen der Rinde

---

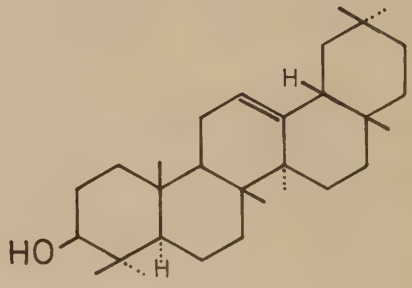
8) R. HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser-Verlag, Basel-Stuttgart 1964 Bd. III (S. 145).

x) Wir danken der Bhinneka Kina Pharma, Bandung (Indonesien) für die Überlassung der Droge.

des Baumes nach Koagulation des ausgetretenen Milchsaftes gewonnen wird[9]. Die uns gelieferte , dem Guttapercha ähnliche grauweiße Droge war anfangs ziemlich zäh, wurde aber nach einigen Wochen porös und ließ sich leicht in Stücke brechen.



α-Amyrin



ß-Amyrin

Zur Herstellung von Lupeol wurde die grob zerschnittene Droge zunächst mehrere Stunden in einer Soxhletapparatur mit 70 %igem Äthanol extrahiert. Nach dem Abkühlen fiel eine weiße Substanz aus, die abfiltriert und längere Zeit mit äthanolischer Kalilauge verseift wurde. Die äthanolische Lösung wurde in etwa das fünffache Volumen Wasser gegossen,und nach 24 Stunden die ausgefallenen Triterpenalkohole nach der Methode von NÖJD[10] aufgearbeitet, um Lupeol von den Isomeren zu trennen. Bei dieser Vorschrift wird nach Benzoylierung der Triterpenalkohole das Benzoatgemisch der Isomere durch fraktionierte Kristallisation aus Benzol/Aceton getrennt: α- und ß-Amyrinbenzoat sind

9) N.H. COHEN, Arch. Pharmaz. 245, 236 (1907).
10) H.D. NÖJD, Arch. Pharmaz. 265, 381 (1927).

in dem Lösungsmittelgemisch leichter löslich als Lupeolbenzoat. Auf diese Weise konnte Lupeolbenzoat in reiner Form erhalten werden.
Nach mehrstündigem Verseifen des Benzoates mit äthanolischer Kalilauge in der Siedehitze erhielten wir dünnschichtchromatographisch reines Lupeol.

2.2. Derivate von Substanz c und Lupeol

Benzoate

Der Schmelzpunkt des aus Bresk gewonnenen Lupeolbenzoates stimmte mit dem von c-Benzoat überein. Der Schmelzpunkt beider Substanzen und der Mischschmelzpunkt lagen bei 256-259°.

Die durch Verseifen der Benzoate gewonnenen freien Alkohole schmolzen beide bei 213-215°, der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression.

Hydrierungsprodukte

Zur weiteren Charakterisierung wurde Substanz c in Eisessig gelöst und bei 60° unter Zusatz von PtO_2 als Katalysator hydriert. Auffallend war, daß die Hydrierung sehr rasch erfolgte. Die Hydrierung von Lupeol verlief ebenso schnell, für 1 Mol Substanz c und 1 Mol Lupeol wurden je 1 Mol Wasserstoff verbraucht. Beide Amyrine können unter diesen Bedingungen nicht in die Dihydroderivate überführt werden.
Der Schmelzpunkt der hydrierten Substanz c lag nach dem Umkristallisieren aus Methanol bei 188-190° und stimmte mit dem aus Lupeol gewonnenen Dihydroderivat überein.

Molekulargewichte

Die Molekulargewichtsbestimmung der freien Triterpenalkohole und ihrer Benzoate erfolgte massenspektrometrisch. Der Molekülpeak von Substanz c und Lupeol lag bei 427 m/e (theoretischer Wert: 426,7), die Untersuchung der Benzoate ergab einen

Molekülpeak bei 531 m/e (theoretischer Wert: 530,8).

Dünnschichtchromatographische Untersuchung

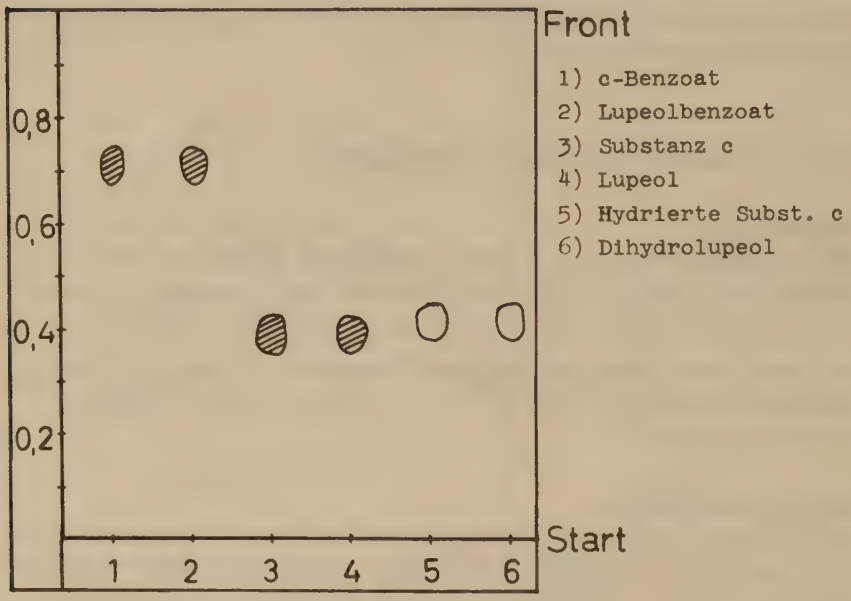


Abb. 2: Vergleich von Substanz c und Derivaten mit Lupeol und den entsprechenden Verbindungen.
Adsorbens: Kieselgel HF 254 "Merck"
Fließmittel: Benzol/Aceton (95,5 : 4,5)
Detektion: Chlorsulfonsäure/Eisessig(1 : 3).

Die freien Alkohole bildeten mit dem Reagens eine stärkere Rotfärbung als die Benzoate, während die hydrierten Substanzen nur gelbbraun angefärbt wurden.

2.3. Farbreaktionen

1) Liebermann-Burchard-Reaktion

Mit Substanz c entstand zunächst eine instabile rote Farbe mit einem Maximum bei 520 nm, die allmählich in eine Gelbfärbung (Maximum: 405 nm) überging. Das hydrierte Produkt zeigte relativ rasch eine stabile Violettfärbung (Maximum: 565 nm). Lupeol und Dihydrolupeol verhielten sich bei der Farbreaktion entsprechend. Nach BRIESKORN[11] ist für den positiven Ausfall der LBR, d. h. für eine Blaugrünfärbung mit einer Absorptionsbande bei mindestens 605 nm, bei Steroiden vor allem die Substitution an C-17 entscheidend: Beim Fehlen der Seitenkette an C-17 tritt die blaugrüne Farbe nicht auf. Liegt eine Doppelbindung an C-20(22) vor, so fällt die LBR ebenfalls negativ aus.

Überträgt man die Verhältnisse auf pentacyclische Triterpene, so entspricht der Ring E der Triterpene der Seitenkette der Steroide. Die exocyclische Doppelbindung des Lupeols an C-20(29) bewirkt jedoch die Hinderung der Farbbildung, so daß nur eine Rotfärbung bei der LBR entsteht. Durch die Hydrierung von Lupeol wird die Absorption nach längeren Wellenlängen verschoben, so daß eine Violettfärbung erreicht wird. Um eine Blaugrünfärbung und damit einen positiven Ausfall der LBR zu erhalten, müßte sich nach BRIESKORN[11] an Stelle der Methylgruppe an C-17 außerdem eine Carboxylgruppe befinden, die aber in Lupeol nicht vorhanden ist, so daß die Reaktion des Dihydroproduktes auf der violetten Farbstufe stehenbleibt.
LIKIERNIK[12] fand 1891 eine charakteristische Lupeolreaktion, die eine Variation der LBR darstellt: Bei bestimmten Mengenverhältnissen soll mit einem Acetanhydrid/Schwefelsäure-Reagens allmählich eine Rotfärbung entstehen, die im Verlauf von 1/2

---

11) C.H. BRIESKORN u. H. HERRIG, Arch. Pharmaz. 292,485 (1959).
12) A. LIKIERNIK, Ber. dtsch. chem. Ges. 24,183 (1891).

Stunde in ein intensives Violett übergehen soll. Die mit Substanz c und Lupeol ausgeführte Farbreaktion reagierte in der angegebenen Weise. Erst nach mehrstündigem Stehen verblaßte die violette Farbe und es entstand eine Gelbbraunfärbung.

Reaktion mit 2,6-Di-tert.butyl-p-kresol

Diese Reaktion wird in der Literatur[5] zur Unterscheidung von Triterpenen und Sterinen vorgeschlagen. Substanz c und Lupeol ergaben mit dem Reagens eine in Aceton lösliche Violettfärbung mit einem ausgeprägten Maximum bei 580 nm, während ß- Sitosterin nur eine schwache Gelbfärbung ausbildete.

Reaktion mit Chlorsulfonsäure/Eisessig-Reagens

Auch diese Farbreaktion soll die Unterscheidung von Triterpenen und Sterinen ermöglichen[6]. Substanz c und Lupeol färbten sich nach Lösen in Chloroform unter Zusatz des Reagenzes gleichermaßen intensiv gelbrot; nach etwa zweistündigem Stehen war die Farbe violettrot geworden (ausgeprägtes Maximum bei 535 nm). ß- Sitosterin bildete zunächst eine relativ scwächere blauviolette Farbe (Maximum: 490 nm) aus, die sich nach einiger Zeit in grün (Maximum: 615 nm) umwandelte.

2.4. IR-Spektren

Pentacyclische Triterpene mit einer 3ß-OH-Gruppe sollen drei intensive Banden nahe 1040, 1025 und 990 cm^{-1} zeigen, während Sterine mit einer 3ß-OH-Gruppe nur eine intensive Bande bei etwa 1025 cm^{-1} besitzen sollen[13]. Liegt die epi-Verbindung des Triterpens vor, so soll eine Bande bei etwa 990 cm^{-1} bleiben, während sich die beiden anderen Absorptionsbanden nach

---

13) J.S. ALLSOP, A.R.H. COLE, D.E. WHITE u. R.L.S. WHILLIX, J.chem.Soc. (London), 1956, 4688.

1063 - 1069 cm^{-1} verschieben. Bei Substanz c (Abb. 3) und Lupeol (Abb. 4) fanden wir 3 Banden bei 980, 1010 und 1040 cm^{-1}, was auf ein Triterpen mit 3ß-OH-Gruppe zutrifft. Im Lösungsmittelspektrum (CCl_4) lag die freie OH-Gruppe sekundärer Alkohole bei 3630 cm^{-1}.

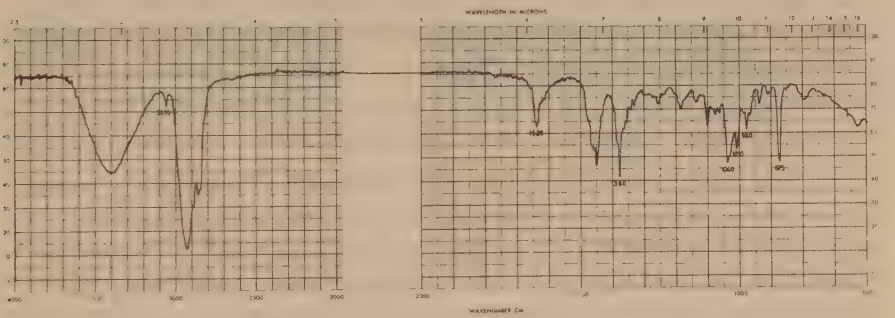


Abb. 3: IR-Spektrum der Substanz c in KBr.

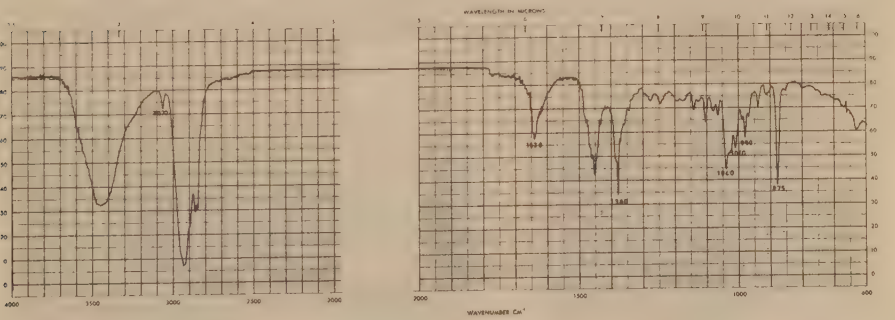


Abb. 4: IR-Spektrum von Lupeol in KBr.

Nach COLE/THORNTON liegt die C = C-Valenzschwingung der Vinylgruppe von Lupeol bei 1640 cm^{-1} (CCl_4), die CH-Valenz- und Spreizschwingungen sollen bei 3073 (CCl_4) und 883 cm^{-1} zu fin-

den sein. Im KBr-Spektrum von Substanz c und Lupeol waren 3 Banden bei 3070, 1638 und 875 cm^{-1} zu sehen.[14)]

Geminale Dimethylgruppen sollen 2 etwa gleichstarke Absorptionsbanden bei 1380 - 1385 und 1365 - 1370 cm^{-1} zeigen[15)]. Da aber angulare Methylgruppen, die in Lupeol und anderen Triterpenen vorliegen, bei etwa 1385 cm^{-1} absorbieren, ist nur das Vorhandensein noch einer Bande bei 1365 cm^{-1} für das Vorliegen einer geminalen Dimethylgruppe charakteristisch. Wir fanden eine sehr starke Bande bei 1380 cm^{-1} und eine schwächere bei 1365 cm^{-1}, die gegenüber ß- Sitosterin mit ebenfalls einer geminalen Dimethylgruppe nicht verstärkt war.

Beim Vergleich der IR-Spektren von Substanz c und Lupeol waren diese identisch. Ebenso stimmten die IR-Spektren weitgehend mit dem der von PANKOW[4)] isolierten Substanz überein. Die zusätzlichen Banden bei 1710 und 1740 cm^{-1} fehlten allerdings bei der von uns gewonnenen Substanz c und Lupeol, so daß sie wahrscheinlich auf eine Verunreinigung zurückzuführen sind. Die Bande bei 980 cm^{-1}, die von PANKOW[4)] einer geminalen Dimethylgruppe zugeordnet und als Beweis für mehrere geminale Dimethylgruppen gewertet wurde, ist nur auf die 3ß-OH-Gruppe zurückzuführen.

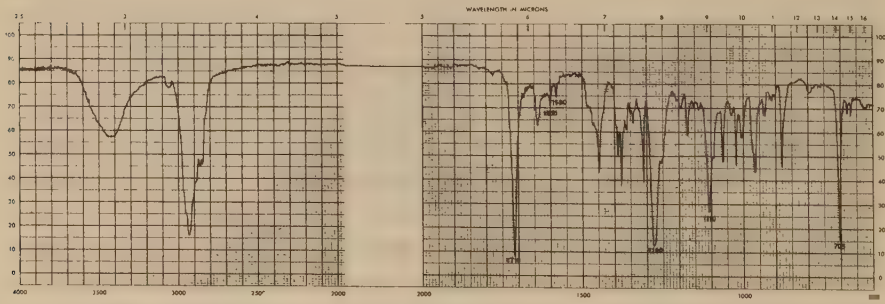


Abb. 5: IR-Spektrum der Substanz c-Benzoat in KBr.

14) A.R.H. COLE u. D.W. THORNTON, J.chem.Soc. (London), 1957, 1332.

15) L.J. BELLAMY, Ultrarotspektrum und chemische Konstitution, 2.Aufl., Dr.D.Steinkopff Verlag, Darmstadt 1966.

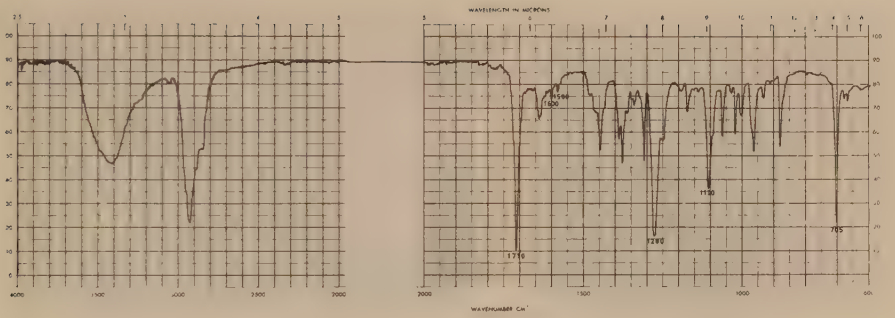


Abb. 6: IR-Spektrum von Lupeolbenzoat in KBr

Die Benzoate beider Verbindungen stimmten ebenfalls in den IR-Spektren überein. Auffallend war die bei 1710 cm^{-1} erscheinende intensive C = O- Valenzschwingung des Esters. Durch C = O-Valenzschwingungen sind auch die zusätzlichen starken Absorptionsbanden bei 1110 und 1280 cm^{-1} zu erklären. Auf Absorptionsbanden des aromatischen Benzolkernes sind folgende intensive Banden zurückzuführen: C = C- Ringschwingungen bei 1600 und 1580 cm^{-1}, die nach RASMUSSEN[16] als typische Anzeichen für das Vorliegen einer Benzoylstruktur gelten sollen, und CH- Waggingschwingungen der 5 benachbarten freien Wasserstoffatome bei 705 cm^{-1}.

Im IR-Spektrum der hydrierten Substanzen (Abb. 7 und 8) waren die von der Doppelbindung herrührenden Banden bei 3070, 1638 und 875 cm^{-1} verschwunden. Das Spektrum der von uns gewonnenen hydrierten Substanz c war identisch mit dem von Dihydrolupeol und stimmte mit dem von PANKOW[4] isolierten hydrierten Produkt überein.

---

16) R.S. RASMUSSEN, D.D. TUNNICLIFF u. R.R. BRATTAIN, J.Amer. chem.Soc. 71, 1068 (1949).

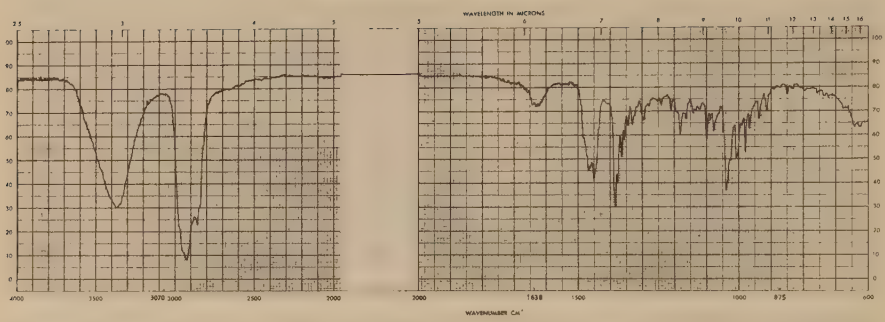


Abb. 7: IR-Spektrum der hydrierten Substanz c in KBr

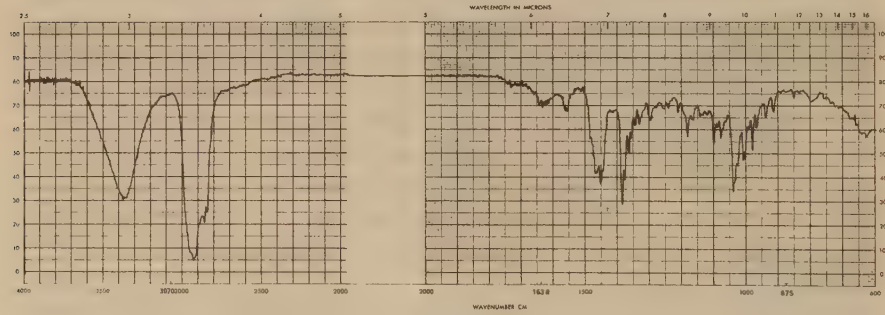


Abb. 8: IR-Spektrum von Dihydrolupeol in KBr

2.5. NMR-Spektren

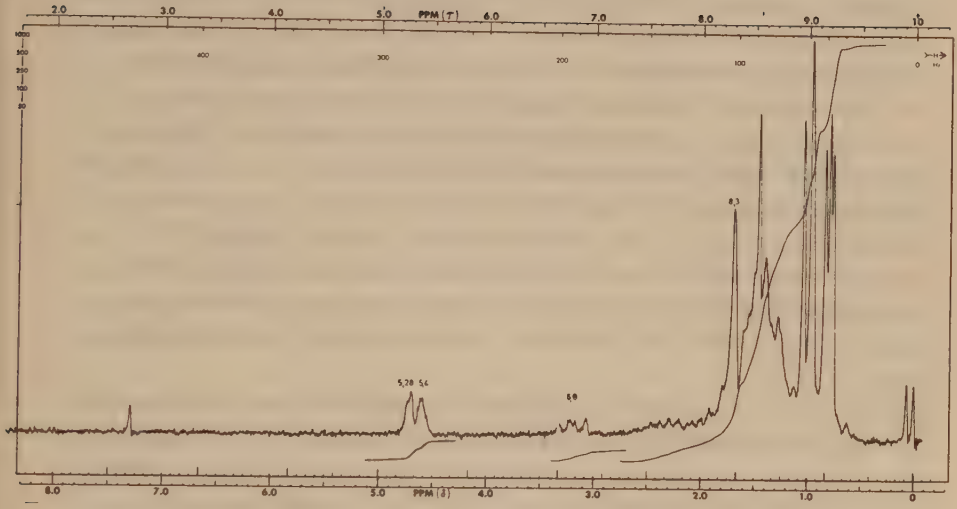


Abb. 9: NMR-Spektrum der Substanz c in $CDCl_3$

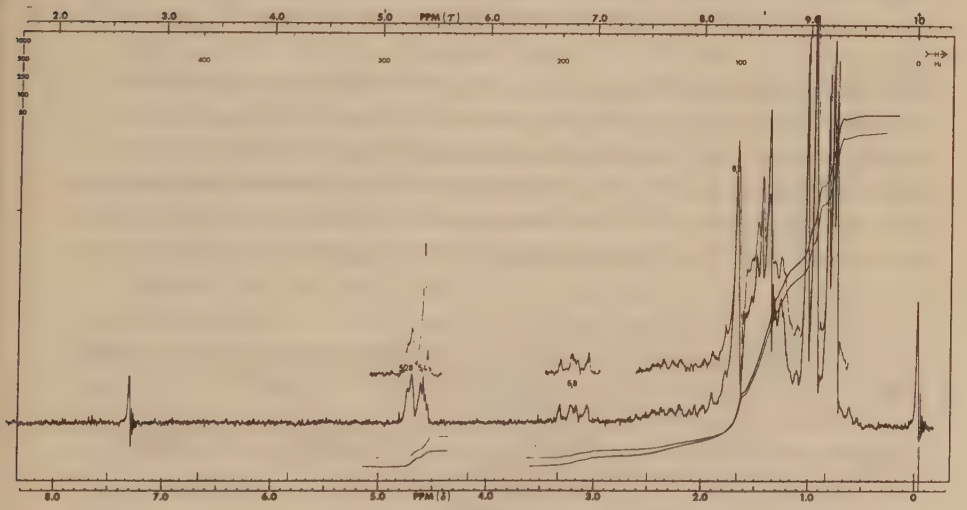


Abb. 10: NMR-Spektrum von Lupeol in $CDCl_3$

Das kernmagnetische Resonanzspektrum der freien Triterpenalkohole gab folgende Hinweise: Bei τ = 5,28 ppm und τ = 5,4 ppm ist je ein olefinisches Proton zu sehen, die einer Vinylgruppe zugeordnet werden können, da die geminale Kopplungskonstante, die zwischen 0 und 3,5 Hz liegen muß, 2,5 Hz beträgt. Bei τ = 6,8 ppm tritt das Quadruplett eines Protons auf, das gemeinsam mit einer OH-Gruppe an einem C-Atom sitzt. Es entspricht offensichtlich dem X- Teil eines ABX-Spektrums. Die chemische Verschiebung von 6,8 ppm deutet auf ein axiales Proton hin. Bei Cyclohexanolen in der Sesselform treten Protonen an der Hydroxylgruppe bei τ = 5,5 - 6,5 ppm in Resonanz, wobei das äquatoriale Proton bei tieferem Feld erscheinen soll als das axiale[17].

Eine weitere Möglichkeit, die axiale oder äquatoriale Lage des X- Protons festzustellen, stellt die Bandenbreite des Signals dar, die von Lage und Orientierung der Nachbarprotonen abhängig ist. Sie setzt sich aus den einzelnen Kopplungskonstanten zusammen. Die Werte dieser Konstanten betragen für die Kopplung benachbarter diaxialer Protonen J_{aa} = 8 - 15 Hz, für die Kopplung zwischen einem axialen und äquatorialen Proton J_{ae} = J_{ee} = 2,5 - 5,5 Hz.[18) 19)]. Auffällig ist das Auftreten eines deutlichen Quadrupletts, was auf das Vorliegen nur einer benachbarten Methylengruppe zum X- Proton (zur OH-Gruppe) hindeutet. Dies träfe bei einem pentacyclischen Triterpen mit einer OH-Gruppe an C-3 zu. Vergleicht man das NMR-Spektrum mit dem von ß- Sitosterin[4)], so tritt dort nur ein unstrukturiertes Multiplett auf. Die Bandenbreite des Quadrupletts wurde nach FELTKAMP[20)] bei 1/4 der maximalen Höhe gemessen und beträgt

---

17) a) J.N. SHOOLERY, M.T. ROGERS, J.Amer.chem.Soc. 80, 5121 (1958).
b) Y. KAWAZOA, Y. SATO, T. OKAMOTO, K. TSUDA, Chem.Pharmac. Bull. (Tokyo) 11, 328 (1958).

18) D.H. WILLIAMS u. N.S. BHACCA, J.Amer.chem.Soc. 86, 2742 (1964).

19) R.U. LEMINEUX, R.K. KULLNIG, H.J. BERNSTEIN, W.G. SCHNEIDER, J.Amer.chem.Soc. 80, 6098 (1958).

20) O.H. FELTKAMP, N.C. FRANKLIN, K.D. THOMAS, W. BRÜGEL, Liebigs Ann.Chem. 683, 64 (1965).

18 Hz. Für eine diaxiale, axial-äquatoriale Kopplung ist eine Bandenbreite von 10,5 - 20,5 Hz, für eine diäquatoriale, axial-äquatoriale Kopplung eine von 5 - 11 Hz zu erwarten. Der gefundene Wert von 18 Hz stimmt gut mit dem erstgenannten überein, so daß bei der Substanz c eine äquatoriale Stellung der OH-Gruppe bzw. ein axiales Proton vorliegen muß.

Bei τ = 8,52 ppm tritt ein gegen D austauschbares Proton auf, das einer aliphatischen OH-Gruppe zuzuordnen ist.
Außerdem sind 6 Methylengruppensignale zu erkennen, von denen eines bei τ = 8,3 ppm einer Methylgruppe an einer Doppelbindung entspricht.

Die NMR-Spektren der Benzoate waren identisch (Abb. 11 u. 12). Durch die Benzoylierung sollte das Signal des Protons an der Hydroxylgruppe, das bei dem freien Triterpenalkohol bei τ = 6,8 ppm auftrat, um 1 - 1,1 ppm nach tieferem Feld verschoben werden. Das Signal des X-Protons der benzoylierten Substanz c und von Lupeolbenzoat lag bei τ = 5,35 ppm, was ebenfalls auf die äquatoriale Lage der OH-Gruppe hindeutet.

Nach Hydrierung von Substanz c und Lupeol (Abb. 13 u. 14) waren die Signale τ = 5,38 und 5,4 ppm, die auf olefinischen Protonen beruhten, verschwunden. Ebenso war das Signal bei τ = 8,3 ppm, das für eine Methylgruppe an einer Doppelbindung beweisend war, nicht mehr vorhanden. Die kernmagnetischen Resonanzspektren der hydrierten Substanzen waren identisch.

Das NMR-Spektrum der von uns isolierten Substanz c sowie das von Lupeol erhaltene Spektrum glichen dem des von PANKOW[4]) hergestellten Produktes. Allerdings wurde das deutliche Quadruplett von Substanz c bei τ = 6,8 ppm nicht erkannt, was auf das Vorhandensein nur einer benachbarten Methylengruppe zur Hydroxylgruppe und damit auf die mögliche Struktur eines pentacyclischen Triterpens hingewiesen hätte. Dies war um so auffälliger, weil das NMR-Spektrum von ß- Sitosterin, mit dem Substanz c in

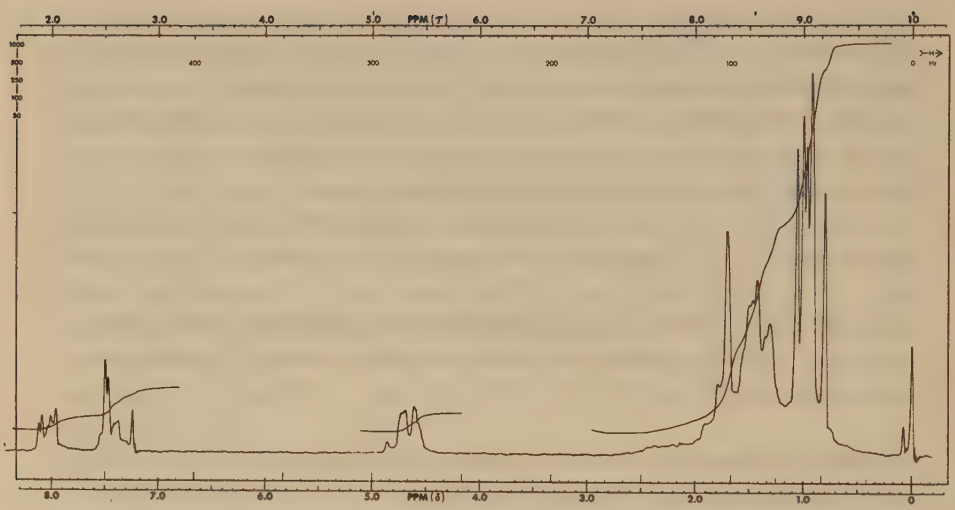


Abb. 11: NMR-Spektrum von Substanz c - Benzoat in $CDCl_3$

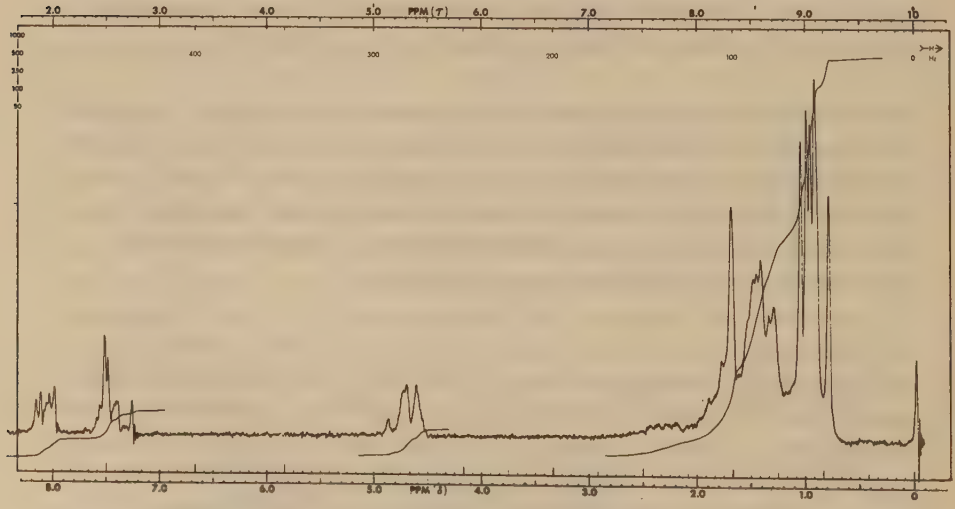


Abb. 12: NMR-Spektrum von Lupeolbenzoat in $CDCl_3$

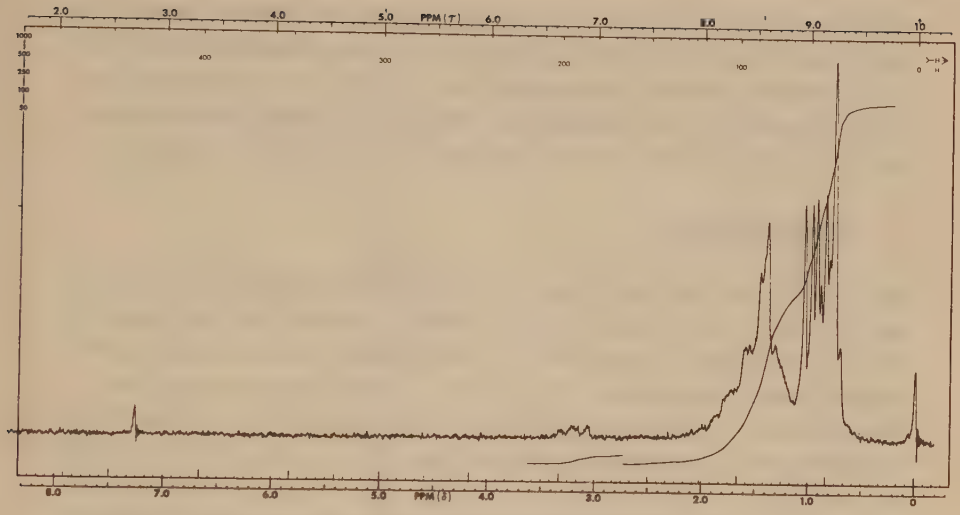


Abb. 13: NMR-Spektrum der hydrierten Substanz c in $CDCl_3$

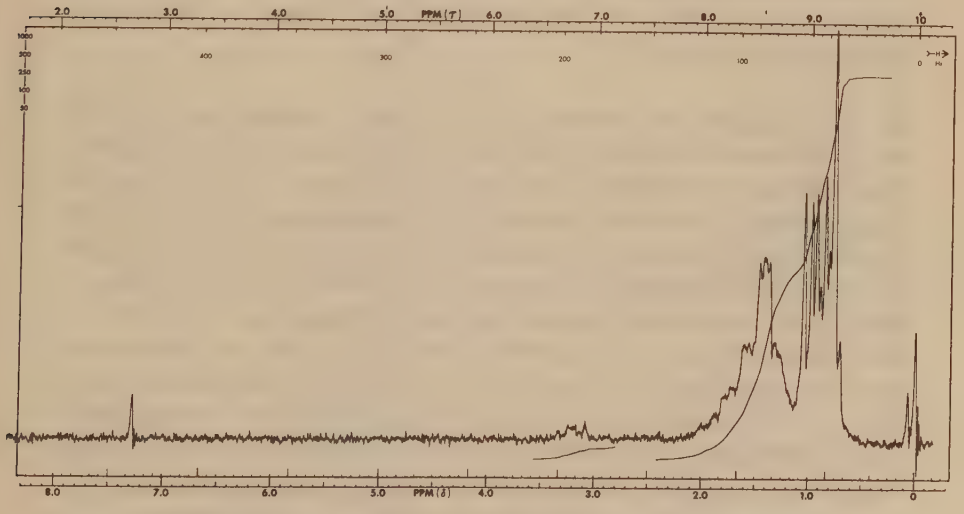


Abb. 14: NMR-Spektrum von Dihydrolupeol in $CDCl_3$

der Arbeit PANKOW[4] verglichen wurde, nur ein unstrukturiertes Multiplett aufwies. Weiterhin wurde die Kopplungskonstante des olefinischen Protons falsch bestimmt und mit 6 Hz an Stelle von 2,5 Hz angegeben. Auch wurde die bei $\tau = 8{,}3$ ppm erscheinende Methylgruppe an einer Doppelbindung nicht berücksichtigt.

2.6. Massenspektren

Bei der vergleichenden Untersuchung der Massenspektren von reiner Substanz c und Lupeol waren diese in Bezug auf die Lage der Peaks identisch, die relativen Intensitäten unterschieden sich jedoch etwas voneinander. Besonders auffallend war, daß der Molekülpeak von Lupeol gegenüber dem von Substanz c wesentlich verstärkt war. Da aber die Bruchstücke von niedriger Massenzahl bei Substanz c intensiver erschienen, ist dieses Verhalten auf unterschiedliche Aufnahmebedingungen hinsichtlich der Temperatur zurückzuführen, die wohl bei Substanz c etwas höher lag. Im wesentlichen glichen die Massenspektren dem von PANKOW[4] veröffentlichten, das noch einige zusätzliche Peaks von höheren Massenzahlen aufwies.

Der Molekülpeak von Substanz c und Lupeol erschien bei m/e 426, das Bruchstück mit der Massenzahl 411 war durch Verlust einer Methylgruppe zu erklären. Bei m/e 383 fanden wir nur einen sehr kleinen Peak, der durch Verlust der Masseneinheit 43 (C_3H_7) zustande kommen konnte. Die Abspaltung einer Isopropylgruppe ist bei bestimmten Lupanderivaten stark begünstigt, was an einem Peak mit einer relativ hohen Intensität erkennbar sein soll. Bei Vergleich der Massenspektren von Lupen-3-on und Lupan-3-on stellte BUDZIKIEWICZ[7] jedoch fest, daß bei Vorhandensein von einer Isopropenylgruppe im Molekül die Tendenz zur Abspaltung einer Isopropylgruppe stark sinkt. Auch starke Substitution des Moleküls verhindert die Bildung des C_3H_7-Bruchstückes. Wie zu erwarten lagen die relativen Intensitäten des Fragmentes m/e 383 sehr niedrig, von Substanz c bei 1,3 %, von Lupeol bei 4 %.

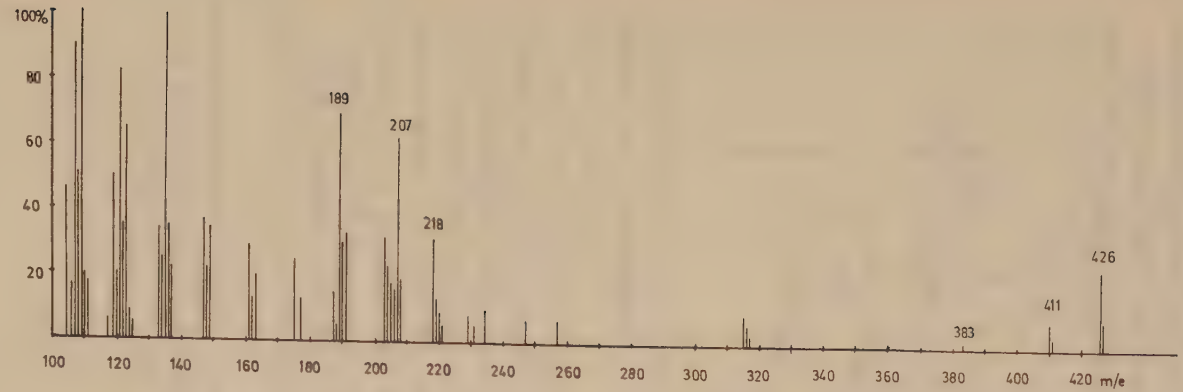


Abb. 15: Massenspektrum von Substanz c

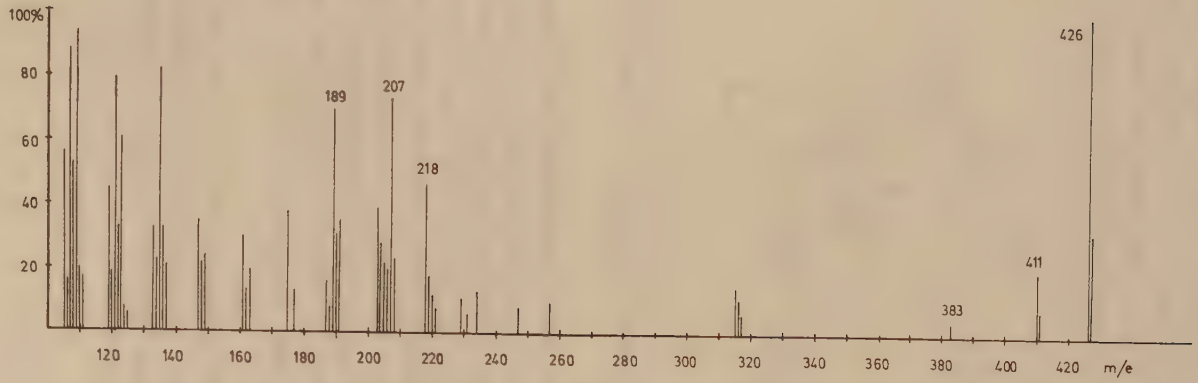
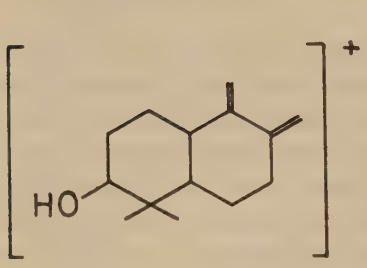
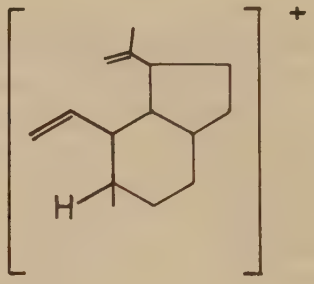


Abb. 16: Massenspektrum von Lupeol

Die bei m/e 220 und m/e 218 vorhandenen Peaks ließen sich nach BUDZIKIEWICZ[7] durch folgende Ionen deuten, wobei die relative Intensität des Peaks bei m/e 218 wesentlich höher sein soll als die bei m/e 220, was auch in beiden Massenspektren zu sehen war:



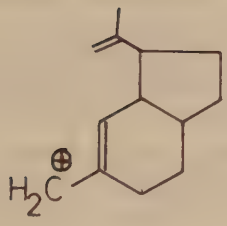
m/e 220



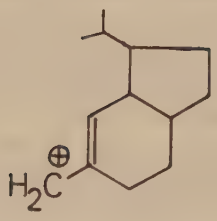
m/e 218

Bei der Untersuchung des massenspektrometrischen Verhaltens verschiedener pentacyclischer Triterpene der Lupanreihe wurde bei allen Verbindungen ein charakteristisches Bruchstück bei m/e 205 bzw. 207 gefunden. Sowohl Lupeol als auch Substanz c wiesen einen intensiven Peak bei m/e 207 auf. Die Deutung dieses Fragmentes ist ungeklärt, durch Deuterierung am C-3 des Ringes A stellte BUDZIKIEWICZ[7] aber fest, daß dieses Bruchstück noch den vollständigen Ring A enthielt, während Spaltstücke unterhalb von m/e 191 diesen anscheinend verloren hatten.

Der intensive Peak bei m/e 189 läßt sich durch Wasserabspaltung aus dem Fragment m/e 207 deuten, außerdem durch folgendes Ion, durch das sich auch der schwächere Peak bei m/e 191 erklären ließe:



m/e 189



m/e 191

Zuordnung: Nach allen diesen Ergebnissen ist die aus Muira puama isolierte Substanz c mit dem pentacyclischen Triterpen Lupeol identisch.

3. Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Lupeol in Muira puama

Bei der Untersuchung mehrerer Drogenmuster von Lignum Muira puama fiel uns auf, daß sowohl die Extraktmenge als auch deren Zusammensetzung, besonders in Bezug auf Lupeol und ß-Sitosterin, stark schwankten. Wir wollten daher zunächst eine photometrische Bestimmung ausarbeiten, die es gestattet, den Gehalt von Lupeol in der Droge möglichst exakt zu erfassen. Die Farbreaktion sollte folgende Bedingungen erfüllen:

1) Stabilität
2) Genügende Empfindlichkeit
3) Spezifität für Lupeol
4) Gute Reproduzierbarkeit

3.1. Vergleich verschiedener Farbreaktionen

Die Liebermann-Burchard-Reaktion erwies sich als quantitativ nicht auswertbar, da sich mit Lupeol nur eine instabile Rotfärbung ausbildete. Zudem entstand mit ß-Sitosterin eine wesentlich intensivere Blaugrünfärbung, die das Maximum der roten Farbe von Lupeol teilweise überlagerte.

Reaktion nach Zlatkis. Beim Versetzen mit einer Lösung von Eisen(III)-chlorid in Eisessig und Unterschichten mit konzentrierter Schwefelsäure bildete sich mit Lupeol eine Rotfärbung mit Maximum bei 490 nm, das allerdings nicht gut ausgeprägt war. Die Reaktion erwies sich als ziemlich empfindlich, mit 250 µg/5 ml Reagens erhält man eine Extinktion von 0,6, was $E^{1\%}_{1cm}$ = 120 bzw. einem molaren Extinktionskoeffizienten von 5110 entspricht (Mol.-Gew. von Lupeol: 426,7).
Mit verestertem Lupeol entstand keine Farbe, der Ester muß vor Ausführung der Bestimmung verseift werden, da nur der freie Triterpenalkohol mit dem Reagens reagiert.

Obwohl diese Farbreaktion relativ empfindlich und auch genügend stabil war, konnte man sie zur Bestimmung von Lupeol in Muira puama nicht verwenden, da ß-Sitosterin ebenfalls mit dem Reagens eine Rotfärbung gibt (Maximum bei 560 nm), die sich mit der des Lupeols überlagert, so daß ß-Sitosterin vor Ausführung der Farbreaktion als Digitonid ausgefällt werden müßte.

Reaktion mit 2,6-Di-tert. butyl-p-kresol. Mit Lupeol entstand eine violette Farbe mit einem ausgeprägten Maximum bei 580 nm.

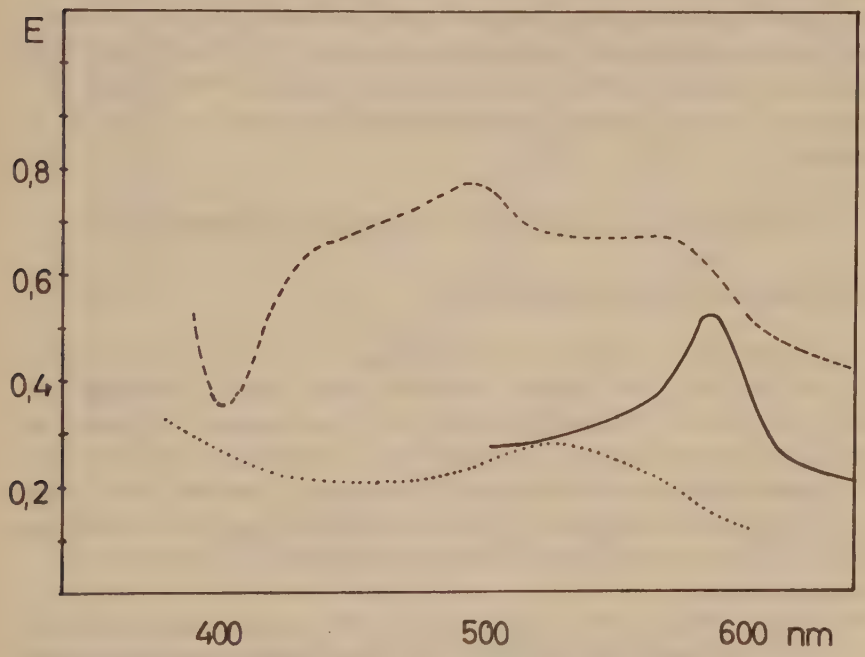


Abb. 17: .....Liebermann-Burchard-Reaktion mit 1 mg Lupeol
------Reaktion nach Zlatkis mit 0,35 mg Lupeol
_____Reaktion mit 2,6-Di-tert.butyl-p-kresol mit 10 mg Lupeol

Zur Erreichung einer Extinktion von 0,3 waren 5 mg reines Lupeol/5 ml Reagens nötig, was $E^{1\%}_{1cm} = 3$ bzw. einem molaren Extinktionskoeffizienten von 128 entspricht. Die Farbreaktion war zwar für Lupeol spezifisch, ß-Sitosterin wurde nicht erfaßt, für eine Gehaltsbestimmung wegen ihrer geringen Empfindlichkeit jedoch nicht geeignet.

Reaktion mit Chlorsulfonsäure/Eisessig. Am günstigsten erschien uns diese Farbreaktion, da sie die oben genannten Bedingungen für eine Gehaltsbestimmung alle erfüllte. Die Auswertung des mit Lupeol entstehenden ausgeprägten Maximums bei 535 nm war für eine quantitative Bestimmung geeignet. Mit 1 mg Lupeol/10 ml Reagens erhielten wir eine Extinktion von 0,35, was $E^{1\%}_{1cm} = 35$ und damit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 1493 entspricht.

3.2. Bestimmung von Lupeol mit der Chlorsulfonsäurereaktion

Das Reagens und seine Variation

Lupeol wurde in einem 10 ml-Meßkölbchen in 2 ml Chloroform p.a. gelöst und mit 5 ml Reagens versetzt. Nach kurzem Erwärmen auf 40° wurde unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Eisessig auf 10 ml aufgefüllt. Das Reagens wurde folgendermaßen bereitet: In 80 Teile Eisessig p.a. werden unter ständiger Kühlung mit Wasser 20 Teile reine Chlorsulfonsäure gegossen. Die Lösung muß jeden Tag frisch hergestellt werden und farblos sein.
Wurde das Reagens statt mit Eisessig mit Acetanhydrid angefertigt, so entstand ein intensiv gelbbraunes Gemisch, das mit Lupeol nur eine braune Farbe mit Maxima bei 410 - 420 nm und 550 nm bildete. Andererseits durfte der als Reagens verwendete Eisessig einen nicht zu hohen Wassergehalt aufweisen, da sonst Hydrolyse der Chlorsulfonsäure eintrat und sich mit Lupeol statt einer rotvioletten eine gelbbraune Farbe entwickelte. Durch Zusatz von 1 % Wasser zum Reagens wurde die Farbbildung

noch nicht beeinflußt; setzte man der Reagenzlösung 5 % Wasser zu, so war eine Bestimmung mit dieser Mischung nicht mehr durchführbar.

Temperaturabhängigkeit

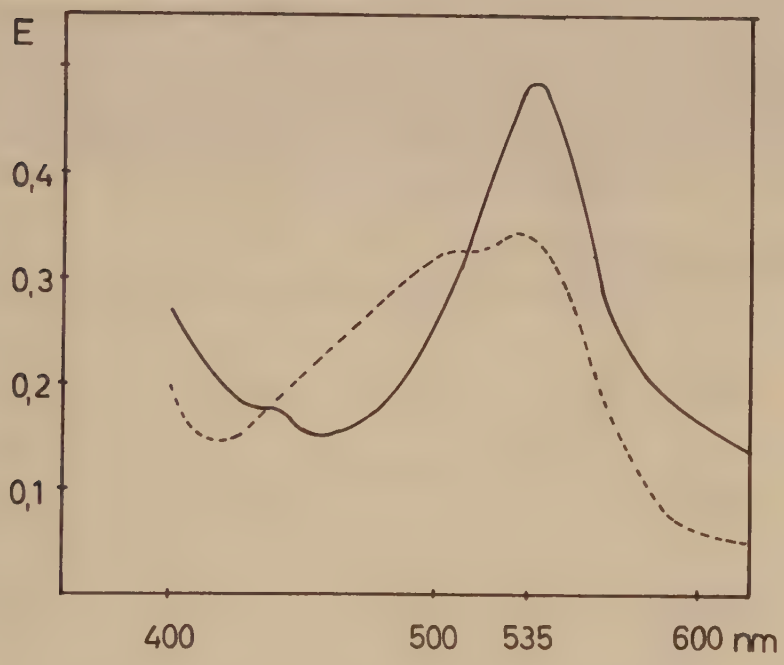


Abb. 18: ------ Chlorsulfonsäurereaktion mit 1 mg Lupeol nach 1/2 Std. bei 20°
——— Chlorsulfonsäurereaktion mit 1 mg Lupeol, 15 min erwärmt auf 40°, nach 1/2 Std. bei 20°

C.H. BRIESKORN und M. BRINER versuchten die Chlorsulfonsäurereaktion zur Bestimmung von Triterpensäuren in Labiaten (Ursol-

und Oleanolsäure) auszunutzen[21]. Sie erhielten dabei eine violette Lösung, deren Farbe aber instabil und daher für eine Gehaltsbestimmung nicht geeignet war. Dagegen bildete sich mit Lupeol eine stabile rotviolette Farbe,die aber stark temperaturabhängig war. Die Farbreaktion ging bei 20° sehr langsam vor sich, das Maximum war nach einer halben Stunde noch nicht stark ausgeprägt. Wurde die Mischung 1/4 Stunde auf 40° erwärmt, so entwickelte sich die Farbe rasch. Nach 1/2 Stunde war ein ausgeprägtes Maximum bei 535 nm zu sehen (Abb. 18). Wurde die Farblösung längere Zeit oder auf eine höhere Temperatur erhitzt, so war eine zu große Abnahme der Farbintensität zu beobachten, weshalb die Erwärmung am besten in der oben angegebenen Weise und nach anschließendem Abkühlen auf 20° durchgeführt wird.

Stabilitätsmessung

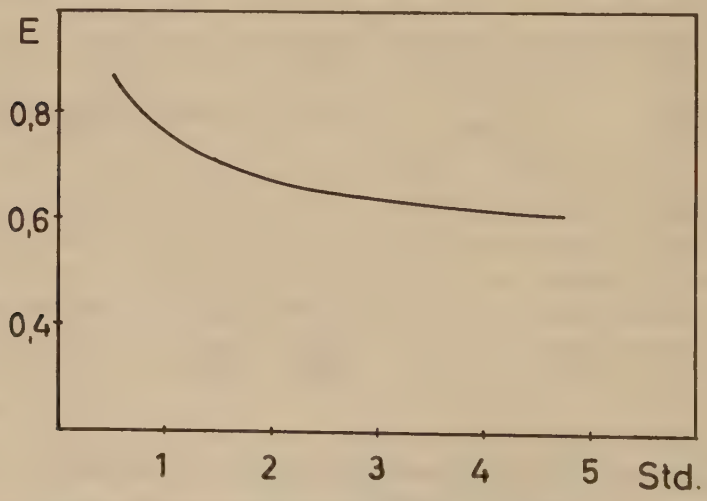


Abb. 19: Stabilitätskurve von 2 mg Lupeol, gelöst in 2 ml $CHCl_3$, nach Zugabe von 5 ml Chlorsulfonsäure-Reagens und nach 15 min Erwärmen auf 40°

21) C.H. BRIESKORN u. M. BRINER, Arch. Pharmaz. 287, 429 (1954).

Bei Messung der Stabilität in Abhängigkeit von der Zeit stellten wir fest, daß das Maximum zu Anfang der Messung relativ rasch abnahm, sich aber die Extinktion nach 3 Stunden nur wenig veränderte und etwa 1 Stunde konstant blieb (Abb. 19). Wurde die Mischung statt 15 min 30 min auf 40° erhitzt, so war die Empfindlichkeit der Reaktion um etwa 1/3 herabgesetzt.

Eichkurve von Lupeol (Abb. 20)

Zwischen 0,5 und 2 mg Lupeol folgt die Farbreaktion dem Lambert-Beerschen Gesetz, weshalb die Drogenmenge von Muira puama, die bestimmt werden soll, möglichst Lupeol innerhalb dieser Grenzen enthalten soll.

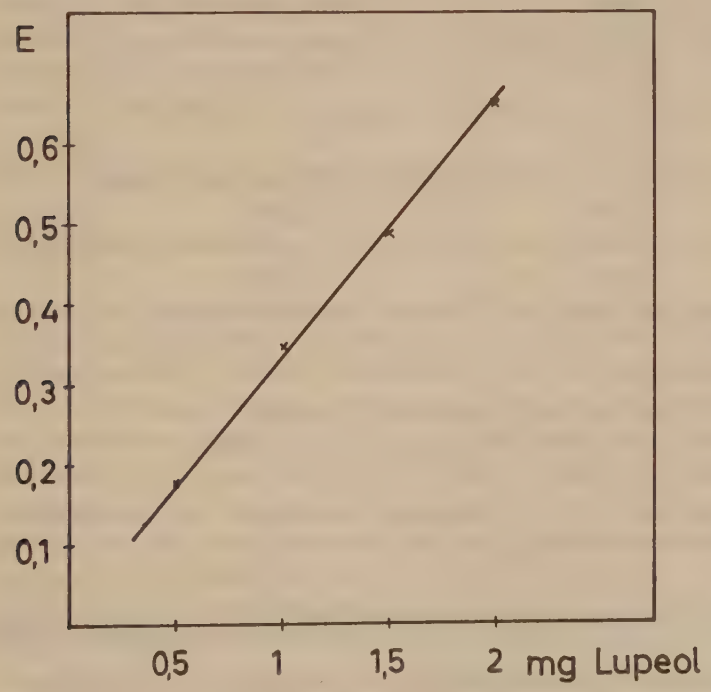


Abb. 20: Eichkurve von Lupeol

Fehlerrechnung bei der Bestimmung von Lupeol

1 mg Lupeol, genau gewogen, wurde in 2 ml Chloroform p.a. gelöst, mit 5 ml des Chlorsulfonsäurereagenzes versetzt, 15 min auf 40° erwärmt und nach dem Abkühlen unter fließendem Wasser mit Eisessig p.a. auf 10 ml aufgefüllt. Nach 3 Stunden wurde die Messung der Extinktion in 1cm-Küvetten gegen eine Blindlösung im Zeiss-Photometer bei 535 nm vorgenommen.

Extinktion 535 nm	Abweichung vom Mittelwert
0,382	+ 0,031
0,314	- 0,037
0,351	0
0,366	+ 0,015
0,343	- 0,008

Mittelwert: 0,351
Mittlerer Fehler des Mittelwertes F_m: 0,0126
Wahrscheinl. Fehler des Mittelwertes F_w: 0,0084
Endergebnis E_w: $0,351 \pm 0,008$
Die Fehlergrenze bei der Bestimmung von Lupeol mit der Chlorsulfonsäurereaktion liegt also bei $\pm$ 2,3 %.

Chlorsulfonsäurereaktion mit verestertem Lupeol und ß-Sitosterin

In Lignum Muira puama liegt Lupeol vorwiegend in veresterter Form vor. Deshalb wurde der aus dem Extrakt durch Umkristalli-

sieren mit Äther gereinigte Ester mit dem Reagens umgesetzt und die Extinktion bei 535 nm gemessen. Wird für den Lupeolester ein Molekulargewicht von 738 zugrunde gelegt[4)], so zeigte sich, daß vergleichbare Mengen nur etwa 1/3 so intensiv wie freies Lupeol reagieren. Dieselbe Reaktion wurde mit dem Lupeolbenzoat (Mol.-Gew. 531) durchgeführt, wobei das der Menge an freiem Lupeol entsprechende Benzoat ebenfalls nur eine 1/3 so starke Extinktion zeigte.
ß-Sitosterin störte die Gehaltsbestimmung des Lupeols nicht. Bei Ausführung der Chlorsulfonsäurereaktion gab das Sterin zunächst eine violette Farbe mit einem Maximum bei 490 nm, die nach 3 Std. in grün (Maximum bei 620 nm) übergegangen war. Bei 535 nm, der Wellenlänge, bei der Lupeol bestimmt wird, besaß ß-Sitosterin ein Minimum. Außerdem reagierten bei der Farbreaktion 2 mg ß-Sitosterin nur etwa 1/5 so stark wie die entsprechende Menge Lupeol, so daß auch ein Überschuß an ß-Sitosterin die Bestimmung nicht stören kann.

3.3. Bestimmung von Lupeol in Muira puama

Extraktion der Droge

Je 10,o g fein gepulvertes Lignum Muira puama wurden je 2 Std. unter ständigem Rühren in der Siedehitze extrahiert. Als Lösungsmittel wurden je 100 ml Petroläther (50 - 70°), Chloroform, Benzol und 96 %iger Äthanol verwendet. Nach dem Abfiltrieren wurde der Rückstand nochmals 1/2 Std. mit dem gleichen Lösungsmittel extrahiert, das Filtrat mit dem ersten Auszug vereinigt und eingedampft.
Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung zeigte sich, daß der Petrolätherextrakt die wenigsten störenden Begleitstoffe enthielt, die Droge war jedoch nach 2 Std. noch nicht vollständig erschöpft. Eine quantitative Extraktion wurde mit Chloroform nach 2 Std. erreicht, die Extraktmenge lag wesentlich höher als bei den entsprechenden Versuchen mit Petroläther und Benzol, enthielt aber auch mehr braune Begleitstoffe, die im

Dünnschichtchromatogramm mit Benzol/Aceton als Fließmittel am Start blieben. 96 %iger Äthanol erschien uns für die Extraktion nicht geeignet, da die Extraktmenge einen hohen Anteil hydrophiler dunkelbrauner Begleitstoffe enthielt.
Daher ist für die Extraktion der Droge am besten Chloroform zu verwenden, da hiermit Lupeol relativ schnell und quantitativ herausgelöst wird.

Hydrolyse des veresterten Lupeols

Die Hydrolyse wurde vorgenommen mit:

a) 20 %iger methanolischer Kalilauge

b) 5 %iger äthanolischer Kalilauge

c) 10 %iger äthanolischer Kalilauge

d) Eisessig

e) Konzentrierter Salzsäure und Äthanol

Dabei zeigte sich, daß die Spaltung des Esters auf saurem Wege nur in geringem Maße zu erreichen ist, mit methanolischer Kalilauge und 5 %iger äthanolischer Kalilauge teilweise vonstatten ging und allein mit mindestens 10 %iger äthanolischer Kalilauge vollständig verlief.
Die Hydrolyse wurde bei allen Versuchen in der Siedehitze unter ständigem Rühren 2 Std. lang ausgeführt, die Verseifungsprodukte mit Äther ausgeschüttelt und dünnschichtchromatographisch untersucht.
Anschließend wurden Versuche durchgeführt, Extraktion und Hydrolyse des Esters in Muira puama in einem Arbeitsgang zu erreichen. Die Droge wurde unter gleichzeitiger Verseifung extrahiert mit: a) einem Gemisch aus Chloroform und äthanolischer Kalilauge
b) 10 %iger äthanolischer Kalilauge.
Diese Methoden erschienen jedoch nicht geeignet, da die Hydrolyse nicht vollständig verlief, und nach Verdünnen mit Wasser der mit Äther aus der alkoholischen Kalilauge extrahierbare An-

teil dunkelbraun gefärbt war, wodurch die Ausführung der Farbreaktion sehr gestört würde.
Die Verseifung des Chloroformextraktes der Droge ist also am besten nach vollständiger Entfernung des Lösungsmittels mit 10 %iger äthanolischer Kalilauge auszuführen, nach dem Abdampfen des größten Teils an Äthanol und Verdünnen mit Wasser ist zum Ausschütteln Äther zu verwenden, da mit Benzol oder Chloroform leichter Emulsionsbildungen stattfinden und außerdem mit diesen Lösungsmitteln ein größerer Teil brauner Begleitstoffe extrahiert wird.

Korrektur der Nullinie

Unter den Drogenmustern, die wir untersuchten, fanden wir zwei Drogen mit so geringem Lupeolgehalt, daß in dem Extrakt von 10 g Droge dünnschichtchromatographisch kein Lupeol nachweisbar war. In den anderen Substanzen stimmten sie aber mit den lupeolhaltigen Drogen überein. An diesen beiden Drogenmustern stellten wir fest, daß die Farbreaktion durch in der Droge enthaltene gelbe Begleitstoffe erheblich gestört wurde, da die Nullinie durch diese erhöht war. Die in dem Chloroformextrakt gelben Bestandteile gingen nämlich beim Erhitzen mit äthanolischer Kalilauge in dunkelgelbe bis braune Stoffe über, die mit Äther ebenfalls teilweise extrahiert wurden. Bei Zusatz des Chlorsulfonsäurereagenzes entstanden daraus dunkelgrüne bis braune Substanzen, die die Bestimmung von Lupeol durch Erhöhung der Nullinie bei 535 nm erschwerten. Gerade bei Drogen, deren Lupeolgehalt gering war und für deren Bestimmung mindestens 2,5 g Holz eingesetzt werden mußte, wurde ein viel zu hoher Lupeolgehalt vorgetäuscht.

Wir untersuchten mehrere Methoden zur Korrektur der Nullinie:

a) Verwendung von Aktivkohle als Adsorbens

Der Versuch, durch Schütteln mit Aktivkohle die gelben Verunreinigungen aus der ätherischen Lösung zu entfernen, verlief negativ. Zwar werden sekundäre lipophile Pflanzeninhaltsstoffe

der aromatischen Reihe wie z. B. Cumarine, Flavonoide oder Lignane von Aktivkohle gut adsorbiert[22]; die in unserem Extrakt enthaltenen gelben Begleitstoffe konnten aber auch durch Zusatz von relativ viel Aktivkohle nicht vollständig entfernt werden. Außerdem wurde neben den Begleitstoffen Lupeol teilweise adsorbiert. Um den Verlust an Lupeol festzustellen, wurde eine bekannte Menge Lupeol in Äther gelöst und mit Aktivkohle geschüttelt. Der Verlust an Lupeol betrug 15 - 20 %, weshalb diese Methode eine zu große Fehlerquelle der Bestimmung bildet.

b) Bestimmung des Mittelwertes der Nullinie mit lupeolfreien Drogen.

Zur Korrektur der Nullinie verwendeten wir die zwei Drogen, die in 10,o g Holz kein nachweisbares Lupeol enthalten hatten.

10,o g des fein gepulverten Holzes wurden mit Chloroform extrahiert, nach völligem Entfernen des Chloroforms mit 10 %iger äthanolischer Kalilauge verseift und nach Verdünnen mit Wasser mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde in einem Meßkölbchen auf 10 ml gebracht, und die Farbreaktion mit 2,5 ml der Ätherlösung (entsprechend 2,5 g Droge) wie vorher beschrieben nach Abdampfen des Lösungsmittels durchgeführt. Die Messung der Extinktion der Farblösung bei 535 nm gab folgende Werte:

1) 0,258
2) 0,128
3) 0,148
4) 0,211

Mittelwert: 0,185

Werden zur Bestimmung von Lupeol in Muira puama 2,5 g Droge benötigt, was bei den meisten lupeolarmen Drogen der Fall ist, so ist zur Korrektur der erhöhten Nullinie von der Extinktion bei

---

22) R. HÄNSEL u. L. KLAPROTH, Arch. Pharmaz. 299, 71 (1966).

535 nm der gefundene Mittelwert von 0,185 abzuziehen, um den tatsächlichen Lupeolgehalt zu ermitteln. Wird eine andere Drogenmenge für die Bestimmung eingesetzt, so ist die Nullinie bei 535 nm entsprechend der eingesetzten Drogenmenge zu berechnen.

c) Berechnung der Nullinie durch Bestimmung eines zweiten Maximums.

Bei Ausführung der Chlorsulfonsäurereaktion trat bei den lupeol-

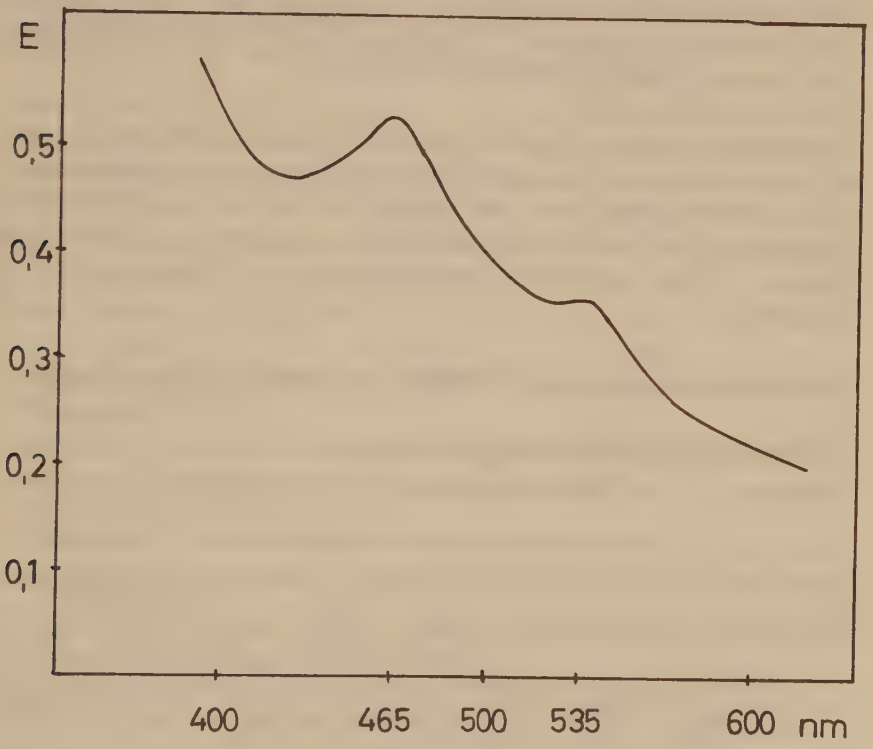


Abb. 21: Chlorsulfonsäurereaktion mit dem verseiften Chloroformextrakt von 2,5 g lupeolarmer Droge.

armen Drogen neben dem Maximum bei 535 nm noch ein zweites intensiveres Maximum bei 465 nm auf(Abb. 21), das bei Ausführung der Reaktion mit reinem Lupeol nicht vorhanden war (Abb. 18). Dieses Maximum scheint für die Menge der in dem Holz vorhandenen braunen Begleitsubstanzen charakteristisch zu sein, da auch die lupeolfreie Droge eine intensive Extinktion bei 465 nm aufwies. Man könnte die Nullinie bei 535 nm dadurch ermitteln, daß man zunächst die Extinktion der lupeolfreien Drogen bei 465 nm und 535 nm bestimmt. Mißt man bei einer lupeolhaltigen Droge ebenfalls die Extinktion bei 465 nm, so kann man aus ihrer Höhe relativ auf die Menge der vorhandenen Begleitstoffe schließen, die je nach Droge verschieden sein kann.

Die Korrektur der Nullinie wurde bei Drogen, die so wenig Lupeol enthielten, daß 2,5 g des Holzes für eine Bestimmung eingesetzt werden mußte, nach der Methode b, die auf der Mittelwertbestimmung der Nullinie lupeolfreier Drogen beruht, vorgenommen. Methode a und c sind wegen Ungenauigkeit und Umständlichkeit abzulehnen.

Fehlerrechnung für die Bestimmung von Lupeol in Muira puama

a) Bestimmung einer lupeolarmen Droge

Einwaage: 2,5 ml der Ätherlösung = 2,5 g Droge A

Extinktion 535 nm	E nach Korrektur	% Lupeol	Abweichung vom Mittelwert
0,372	0,167	0,022	+ 0,004
0,339	0,154	0,018	0
0,305	0,120	0,015	+ 0,003
0,314	0,129	0,016	- 0,002

Mittelwert: 0,018 % Lupeol
Mittlerer Fehler des Mittelwertes F_m: 0,025
Wahrscheinl. Fehler des Mittelwertes F_w: 0,002
Endergebnis E_w: 0,018 $\pm$ 0,002 %

Die Fehlergrenze bei der Bestimmung von Lupeol in einer lupeolarmen Droge liegt bei 10 %; dies bedeutet jedoch bei dem geringen Lupeolgehalt der Droge A nur einen Unterschied von 2 mg, bezogen auf 100 g Muira puama.

b) Bestimmung einer lupeolreichen Droge

Einwaage: 0,5 ml des Ätherextraktes = 0,5 g Droge E

Extinktion 535 nm	% Lupeol	Abweichung vom Mittelwert
0,458	0,275	+ 0,005
0,495	0,295	+ 0,025
0,418	0,250	- 0,02

Mittelwert: 0,27 %
Mittlerer Fehler des Mittelwertes F_m: 0,019
Wahrscheinl. Fehler des Mittelwertes F_w: 0,013
Endergebnis E_w: 0,27 $\pm$ 0,013 %

Die Fehlergrenze bei der Bestimmung von Lupeol in einer lupeolreichen Droge liegt bei 5 %, entsprechend einem Unterschied von 13 mg, bezogen auf 100 g Muira puama.
Ein Korrekturfaktor ist bei der lupeolreichen Droge nicht zu berücksichtigen, da zur Bestimmung nur 1/5 der lupeolarmen Droge eingesetzt wird. Eine Korrektur mit 1/5 des Korrekturfaktors wäre aber unsinnig.

Ermittlung des Fehlers bei Zugabe einer bekannten Lupeolmenge zur Droge

a) 10,o g Droge B wurden 2,5 mg Lupeol beigemischt. Da für die Bestimmung 2,5 ml des Ätherextraktes, entsprechend 2,5 g Droge, verwendet wurden, mußten 0,625 mg Lupeol wiedergefunden werden. Bei der quantitativen Bestimmung erhielten wir den Wert von 0,525 mg, dies entsprach 82 % des zugefügten Lupeols.

b) 10,o g Droge B wurden 5,1 mg Lupeol zugemischt. Dies entsprach in 2,5 g Droge 1,27 mg Lupeol, die quantitativ wiedergefunden wurden.

Während bei geringen Lupeolmengen leicht ein Verlust des Triterpens eintritt, können größere Mengen Lupeol mit der Chlorsulfonsäurereaktion quantitativ bestimmt werden.

3.4. Bestimmung des Lupeolgehaltes in verschiedenen Drogenmustern und Zubereitungen von Muira puama

Droge	Menge	Extinktion 535 nm	E nach Korrektur	% Lupeol
A	2,5 g	0,332	0,146	0,02
B	2,5 g	0,185	0	0
C	2,5 g	0,260	0,074	0,01
D	2,5 g	0,148	0	0
E	0,5 g	0,457	-	0,27
F	2,5 g	0,314	0,128	0,015
G	2,5 g	0,381	0,195	0,025

Auffallend war der sehr hohe Lupeolgehalt der Droge E gegenüber den anderen Drogenmustern.

Außerdem untersuchten wir den Lupeolgehalt von 2 Zubereitungen der Droge:

Zubereitung	Menge	E bei 535 nm	E n.Korr.	% Lupeol
Extr. Muira puama aqua sicc.	2,5 g	0,185	0	0
Extr. Muira puama fld. Erg. B.6	2,5 g	0,196	0	0

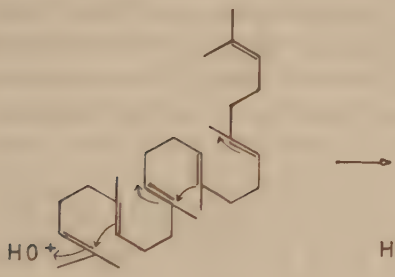
Im DC beider Zubereitungen war kein Lupeol nachweisbar. Im wäßrigen Trockenextrakt war dies wegen der Unlöslichkeit des Lupeols in Wasser zu erwarten gewesen. Im alkoholischen Fluidextrakt hätte jedoch auf Grund der besseren Löslichkeit des Lupeols in Alkohol bei Verwendung einer lupeolreichen Droge ein wenigstens geringer Lupeolgehalt nachweisbar sein müssen. Wir stellten daher aus der lupeolreichen Droge E nach dem Erg. B.6 mit 70 %igem Äthanol einen alkoholischen Extrakt her, dessen Lupeolgehalt mit der Chlorsulfonsäurereaktion quantitativ bestimmt wurde:

Zubereitung	Menge	E bei 535 nm	E nach Korr.	% Lupeol
Extr. Muira puama fld.Erg.B.6 aus Droge E	2,5g	0,916	0,544	0,07

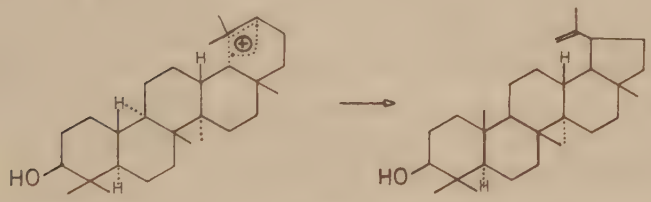
Die mit Alkohol extrahierte Triterpenmenge lag zwar wesentlich niedriger als die aus der gleichen Drogenmenge mit Chloroform gewonnene, aber höher als der Lupeolgehalt lupeolarmer Drogen.

4. Quantitative Bestimmung von ß-Sitosterin in Muira puama mit der Liebermann-Burchard-Reaktion

Neben dem Lupeolgehalt interessierte uns auch der ß-Sitosteringehalt der Droge. Biosynthetisch werden Lupeol und ß-Sitosterin nämlich auf ähnliche Weise aufgebaut. Als gemeinsame Vorstufe wurde Squalen erkannt, das auch in geringer Menge in Pflanzen mit Triterpen- und ß-Sitosteringehalt gefunden wurde. Die Umwandlung von Squalen in Lupeol soll folgendermaßen erfolgen[23]:



I Squalen II



III IV Lupeol

23) A. ESCHENMOSER, L. RUZICKA, O. JAEGER u. D. ARIGONI, Helv. chim. Acta 38, 1890 (1955).

Ob überhaupt pentacyclische Triterpene gebildet werden, soll von dem Vorhandensein von ätherischem Öl in der Droge abhängig sein, wobei allerdings die absolute Menge an ätherischem Öl in keinem Zusammenhang mit dem Triterpengehalt stehen soll. Von REBOURGEON[2] wurde in Muira puama ätherisches Öl gefunden, während PECKOLT[3] dessen Anwesenheit bestritt.
Für die Bildung von Triterpenen aus niedermolekularen Bausteinen soll außerdem das Vorhandensein polymerisierend wirkender Enzymsysteme notwendig sein[24]. Da aber Verbindungen, die durch Enzyme synthetisiert werden, sich meist auch durch diese wieder abbauen lassen, spielt die Behandlung der Droge nach der Ernte und ihre Lagerung für den Gehalt an Triterpenen oft eine wichtige Rolle. So wurde z. B. gefunden, daß Labiaten nach langsamer Lufttrocknung weniger Ursolsäure (pentacyclische Triterpensäure) enthielten als Pflanzen, die sofort nach der Ernte im Trockenschrank auf 105° erhitzt wurden.

Der unterschiedliche Lupeolgehalt der Drogen A, B, C, D und G könnte daher auf die Lagerbedingungen zurückgeführt werden, während der hohe Lupeolgehalt der Droge E nicht so erklärt werden kann.

Wir wollten den ß-Sitosteringehalt in den verschiedenen Drogenmustern bestimmen und untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen Lupeol- und ß-Sitosteringehalt besteht. Auf Grund der Biosynthese aus der gemeinsamen Vorstufe Squalen könnte man vermuten, daß die Bildung von Sterin und Triterpen nebeneinander eine Konkurrenzreaktion ist, bei der bei hohem Triterpengehalt ein niedriger Sterolgehalt gefunden wird und umgekehrt.

Für die photometrische Gehaltsbestimmung von ß-Sitosterin wurde die Methode von BRIESKORN[25] angewandt, die auf der quantitati-

---

24) C.H. BRIESKORN u. M. BRINER, Arch. Pharmaz. 286, 501 (1953).
25) C.H. BRIESKORN u. H. HOFMANN, Arch. Pharmaz. 297, 577 (1964).

ven Auswertung der Liebermann-Burchard-Reaktion (LBR) beruht. Diese Farbreaktion war deshalb besonders gut für die Ermittlung des ß-Sitosteringehaltes in Muira puama geeignet, weil nur ß-Sitosterin mit dem Reagens eine genügend stabile Grünfärbung mit einem Maximum über 600 nm bildet. Die mit Lupeol entstehende instabile Rotfärbung, die allmählich in gelbbraun übergeht (s.S. 11), störte die Bestimmung nicht durch Überlagerung der Grünfärbung oder Erhöhung der Nullinie.

Der ß-Sitosteringehalt von Muira puama war in dem Chloroformextrakt nicht direkt bestimmbar, da das Sterin in teils freier, teils veresterter Form vorlag. Sterinester sollen aber bei der LBR intensiver als ihre freien Alkohole reagieren, da der Mechanismus der Farbreaktion bei freien Sterinen folgendermaßen gedeutet wird[25]: Zunächst soll die Veresterung der alkoholischen OH-Gruppe mit Schwefelsäure erfolgen, das daraus entstehende Sterylsulfat soll in Sterylacetat und schließlich in Episterylacetat umgewandelt werden. Aus diesem wird wahrscheinlich ein Dien mit Doppelbindungen in 3(4)- und 5(6)-Stellung gebildet. Liegt das Sterin aber schon in veresterter Form vor, so soll die Epimerisierungsreaktion weitgehender möglich sein als bei einem freien Hydroxyl, das erst verestert werden muß. Außerdem wird bei Estern die Entstehung einer Doppelbindung in 7(8)-Stellung angenommen. Veresterung der OH-Gruppe führt nämlich zu einem ähnlichen Verhalten wie es Sterine mit 2 Doppelbindungen im Ring B zeigen.
Da bei direkter Bestimmung des ß-Sitosteringehaltes im Chloroformextrakt der Droge ein zu hoher Gehalt durch die veresterte Form vorgetäuscht würde, mußte der Extrakt vor Ausführung der Bestimmung mit äthanolischer Kalilauge verseift, und nach dem Verdünnen mit Wasser das freie Sterin mit Äther ausgeschüttelt werden. Dies hatte aber den Vorteil, daß wir mit einem Teil des Ätherextraktes, den wir für die Bestimmung des Lupeolgehaltes verwendet hatten, gleichzeitig die quantitative Bestimmung von ß-Sitosterin durchführen konnten.

Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums der bei Ausführung der LBR entstehenden Grünfärbung soll von folgenden Faktoren abhängig sein[25]:

1) Struktur der Seitenkette des Sterins:
Eine Verlängerung der Seitenkette oder eine Verzweigung an C-24 sollen eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums d. h. eine Verschiebung nach längeren Wellenlängen hervorrufen. Ebenso soll eine Doppelbindung in der Seitenkette wirken.

2) Zusammensetzung des Reagenzes:
Bei einem höheren Anteil an Schwefelsäure soll eine Verschiebung nach kürzeren Wellenlängen erreicht werden, da durch vermehrte Anlagerung der Säure an das Sterin eine Aufspaltung der Doppelbindungskette in kleinere, unabhängig voneinander absorbierende Chromophore erfolgt.

Bei Ausführung der Farbreaktion mit dem verseiften Chloroformextrakt der Droge beobachteten wir, daß der Anstieg der Extinktion unter gleichzeitiger Verschiebung der Absorption nach längeren Wellenlängen zu Anfang relativ schnell erfolgte. Nach etwa 25 min war das Maximum der Extinktion bei 668 nm erreicht, danach fiel die Extinktion nur allmählich ab, so daß die Messung zwischen 25 und 28 min nach Reagenzzusatz durchgeführt werden konnte. Das von uns als Eichsubstanz verwendete ß-Sitosterin, das sich bei der Farbreaktion hinsichtlich der Absorption bei der maximalen Extinktion genauso wie das in Muira puama enthaltene ß-Sitosterin verhielt, bestand aus 75 % ß-Sitosterin und 25 % Campesterin. Dies stimmte mit den Untersuchungen von IWASA[26] überein, der in Muira puama neben ß-Sitosterin auch Campesterin fand.

---

26) J. IWASA u. Y. KIMURA, J. pharmac. Soc. Japan 89, 1172 (1969).

4. 1. Bestimmung des ß-Sitosteringehaltes in verschiedenen Drogenmustern und Zubereitungen von Muira puama

Droge	Menge	Extinktion 668 nm	% ß-Sitosterin
A	2,5 g	0,626	0,025
B	2,5 g	0,842	0,035
C	0,5 g	0,451	0,095
D	2,5 g	0,900	0,04
E	1,0 g	0,464	0,05
F	2,5 g	0,815	0,03
G	0,5 g	0,460	0,095

Bei den einzelnen Drogenmustern differierten die gefundenen ß-Sitosterinmengen zwar zum Teil beträchtlich, es war jedoch keine Droge darunter, die wie Droge E hinsichtlich des Lupeolgehaltes einen so auffallenden Unterschied aufwies. Außerdem enthielt jede untersuchte Droge einen nachweisbaren und durch die Bestimmung erfaßbaren ß-Sitosteringehalt.

Untersuchung von 2 Zubereitungen der Droge:

Zubereitung	Menge	Extinktion 668 nm	% ß-Sitosterin
Extr. Muira puama aqua sicc.	2,5 g	0,0	0
Extr. Muira puama fld. Erg. B. 6	2,5 g	0,086	0,004

Der wäßrige Trockenextrakt enthielt wie zu erwarten wegen der Unlöslichkeit des ß-Sitosterins in Wasser kein ß-Sitosterin, während der alkoholische Extrakt einen allerdings wesentlich niedrigeren Anteil an ß-Sitosterin als die vergleichbare Menge Droge aufwies. Im DC des alkoholischen Fluidextraktes war im Gegensatz zu Lupeol ß-Sitosterin nachweisbar.

Die Fehlerrechnung bei der Bestimmung von ß-Sitosterin in Droge A mit der LBR ergab 5 %, dies entspricht einem Unterschied von 1,3 mg, bezogen auf 100 g Droge A.

4. 2. Übersicht über den Lupeol- und ß-Sitosteringehalt

Droge	% Lupeol	% ß-Sitosterin
A	0,02	0,025
B	0	0,035
C	0,01	0,095
D	0	0,04
E	0,27	0,05
F	0,015	0,03
G	0,025	0,095

Vergleicht man den Gehalt an Triterpen und Sterin in den einzelnen Drogen, so ist kein Zusammenhang zu finden. Die Bildung der beiden Substanzen in der Pflanze scheint unabhängig voneinander zu sein und sich trotz der Biosynthese aus der gemeinsamen Vorstufe Squalen nicht gegenseitig zu beeinflussen. Dies stimmt mit den Untersuchungen von NICHOLAS[27] überein, der den Gehalt von ß-Sitosterin und Triterpen in 2 Pflanzen während verschiedener Wachstumsperioden bestimmte. Dabei konnte er feststellen, daß der Gehalt beider Stoffe mit zunehmendem Alter der Pflanzen gleichmäßig anstieg, weshalb er eine Konkurrenzreaktion bei der Bildung ausschloß.

27) H. J. NICHOLAS, J. pharmac. Sci. 50, 645 (1961).

5. Untersuchung von in Muira puama vorhandenen Pilzen auf ihren Lupeolgehalt

Bei der pharmakognostischen Untersuchung der Droge fielen KLEESATTEL[28] als Eigentümlichkeit von Muira puama knotige Anschwellungen an bestimmten Teilen des Holzes auf. Diese rührten seiner Ansicht nach von Pilzmycelwucherungen her, da die in den Zellen befindlichen braunen homogenen Inhaltsstoffe von zarten Hyphen eines Pilzmycels durchzogen waren. Außerdem beschrieb er als weiteres Charakteristikum schwarze Flecke an der Wurzelrinde, die er für Pilzmycelkomplexe hielt. Diese traten zwar auch an der Stammrinde, dort aber nur vereinzelt auf.

E. ANSELMINO[1] führte die Wucherungen auf die Haftscheiben von verkümmerten Haustorien zurück, da sich die Droge autoparasitär verhalten soll. Das ihrem Bericht nach nur zum Teil vorhandene Pilzmycel, das sie besonders stark an Schnittflächen und in der Rinde fand, war ihrer Ansicht nach postmortal eingedrungen wie auch von TSCHIRCH[29] bestätigt wurde.

TUNMANN[30] dagegen berichtete wieder von charakteristischen Pilzen, die in Form kleiner schwärzlicher Punkte auf der Rinde mit bloßem Auge erkennbar seien und deren reichverzweigte, bläulichschwarze bis bräunliche Mycelfäden die Droge in allen Teilen durchzögen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Droge A und E konnten wir kein Pilzmycel entdecken wie es von KLEESATTEL oder TUNMANN beschrieben worden war. Wir fanden nur fädige Strukturen, die eventuell auf einen Pilz hindeuteten.

Während Triterpene bisher noch nicht in Bakterien gefunden

---

28) H. KLEESATTEL, Ber.dtsch.Pharm.Ges. 3, 67 (1893).
29) TSCHIRCH, Handbuch der Pharmakognosie III, 1, 736 (1923).
30) TUNMANN in Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Verlag J. Springer, Berlin 1927.

wurden, sind höhere Pilze wie Basidiomycetes (z.B. Polyporus) oder Ascomycetes (z.B. Saccharomyces) durchaus zu ihrer Synthese fähig. Da es denkbar wäre, daß ein in Muira puama vorhandener Pilz die Bildung der Inhaltsstoffe oder ihre quantitative Zusammensetzung beeinflussen könnte, und damit der unterschiedliche Lupeolgehalt von Droge A und E zu erklären wäre, wollten wir versuchen, aus dem Holz von Muira puama einen Pilz in Reinkultur zu züchten. Durch dünnschichtchromatographische Untersuchung des Pilzmycelextraktes wollten wir dann feststellen, ob er Lupeol enthielt. Ein ähnlicher Versuch ist von LAHEY[31] mit dem auf dem weißfaulen Holz von Eucalyptus regnans wuchernden Pilz Polyporus anthracophilus unternommen worden, der auch in Reinkultur freie Eburicosäure, ein tetracyclisches Triterpen, bildete.

Untersuchung der aus einem Holzstück von Muira puama isolierbaren Pilze:

Nach Bebrüten des Holzes wuchsen darauf mehrere Pilzkulturen, von denen die unbekanntesten ausgewählt und in Reinkultur auf fetten Agarplatten gezüchtet wurden. Wir erhielten 2 unterschiedliche Kulturen[x]:

1) Kulturen, die gelbe Tröpfchen bildeten:
Diese enthielten nach Extraktion mit Aceton und Verseifen mit alkoholischer Kalilauge keine Substanz, die sich dünnschichtchromatographisch wie Lupeol verhielt.

2) Rein weiße Kulturen mit schwarzen Sporangien:
Diese Pilzkultur wurde durch einen Pilz aus der Familie der Mucoraceae gebildet. Die Mucoraceae sind Schimmelpilze, die vor-

---

x) Für die Isolierung und Züchtung der Pilzkulturen danken wir der pharmazeutisch-biologischen Abteilung des Pharmazeutischen Institutes Tübingen unter Leitung von Herrn Prof.Dr.E. Reinhard herzlich.

31) F. M. LAHEY u. P. H. STRASSER, J. chem. Soc. London 1951,873

wiegend saprophytisch, selten parasitisch auf Pflanzen und Tieren leben. Man findet sie häufig auf zu feucht gelagerten Drogen. Die Mucoraceae gehören zu den Phycomycetes (Algenpilzen), einer Klasse, von der die Bildung von komplizierten Stoffen wie Triterpenen nicht bekannt ist. In dem Extrakt des Pilzmycels war Lupeol dünnschichtchromatographisch nicht nachweisbar. Auch die Chlorsulfonsäurereaktion mit dem Extrakt fiel negativ aus.

Höhere Pilze aus den Klassen der Ascomyceten oder Basidiomyceten konnten aus Lignum Muira puama nicht gezüchtet werden, so daß die Bildung des Lupeols in der Droge von Pilzen unabhängig sein dürfte. Bisher wurde Lupeol auch vorwiegend in Pflanzen gefunden, die meist zur Klasse der Dicotyledoneae, seltener zu der der Monocotyledoneae gehören. Die Stammpflanzen von Muira puama, Ptychopetalum olacoides und Ptychopetalum uncinatum, sind Dikotyledonen aus der Familie der Olacaceae, die mit den Loranthaceae und Santalaceae die Ordnung Santalales bilden. In Loranthaceae ist ebenfalls Lupeol gefunden worden.

Da durch die Pilztheorie nicht der unterschiedliche Lupeolgehalt der Drogen A und E erklärt werden kann, wollten wir beide Drogen vergleichend mikroskopisch und mikrochemisch untersuchen, um den differierenden Lupeolgehalt auf eventuelle Unterschiede im Drogenmaterial zurückzuführen.

6. Mikroskopischer und mikrochemischer Vergleich einer lupeolreichen mit einer lupeolarmen Droge

Bei der äußerlichen Betrachtung beider Drogen fiel auf, daß die lupeolreiche Droge E im Vergleich zur Droge A eine wesentlich dunklere Rinde besaß. Die Rinde der Droge E war dunkelbraun bis schwarz und stimmte damit mit dem von PANKOW[4)] beschriebenen und verarbeiteten Holz überein. Droge A und alle anderen quantitativ untersuchten wiesen eine hellere, graubraune Rinde auf.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Drogen waren außer der Rinde keine Unterschiede zu erkennen. Das Holz der beiden Drogen war genauso aufgebaut und auf diesem Wege nicht voneinander unterscheidbar.
Für Muira puama werden 2 Stammpflanzen angegeben, Ptychopetalum olacoides und Ptychopetalum uncinatum, wobei erstere eine rotbraune bis schwarze Rinde besitzen soll. Das Holz beider Arten soll anatomisch so ähnlich sein, daß eine einwandfreie Unterscheidung nicht möglich sein soll[32)].

Bei der Schnittdroge E schien es sich wegen der Färbung der Rinde vorwiegend um die Art Ptychopetalum olacoides zu handeln, die in früheren Jahrzehnten allein als Muira puama gehandelt wurde. Ptychopetalum uncinatum soll erst in den letzten Jahren in den Handel gekommen sein; sie scheint die Stammpflanze aller anderen von uns untersuchten Drogen zu sein, deren Lupeolgehalt relativ gering war.

Um festzustellen, wo und möglichst in welchen Zellen sich Lupeol befindet, wollten wir Droge A und E vergleichend mikrochemisch untersuchen.
Wegen seines liophilen Charakters wurde Lupeol bisher in folgenden Zellen gefunden[33)]:

---

32) E. ANSELMINO, Notizblatt des Botanischen Gartens u. Museums zu Berlin-Dahlem Nr. 107, Bd. XI.
33) K. PAECH u. M.V. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. III, S.61, Springer-Verlag 1955.

a) in Peridermen, in Kutikula und kutikularen Wachsausscheidungen
b) in Milchsaftröhren
c) in den Behältern normaler und pathologischer Exkrete (Harz-, Ölbehälter)
d) als Begleiter von Reservestoffen.

Die mikrochemische Methode von BRIESKORN[34)] nutzt zur Bestimmung von Triterpenen in Drogen die selektive Farbreaktion mit Chlorsulfonsäure aus, wobei nur das Triterpen eine Rotfärbung gibt. Als organisches Lösungsmittel der Chlorsulfonsäure wurde Sesolvan NK (BASF) vorgeschlagen. Das Reagens wurde in 60 bis 70 %iger Lösung angewandt, was sich für die Bestimmung von Lupeol in Lignum Muira puama als zu konzentriert erwies, da eine sehr starke Blasenbildung unter gleichzeitiger Verkohlung des Präparates einsetzte. Deshalb wurde die Untersuchung folgendermaßen durchgeführt:

Nach Aufhellen des Präparates mit Chloralhydratlösung wurde diese mit Filtrierpapier weitgehend abgesaugt, dann auf das Präparat erst 2 Tropfen Sesolvan NK und anschließend 1 Tropfen 60 %iger Chlorsulfonsäure in Sesolvan gegeben. Die sich relativ schnell bildende Rotfärbung konnte jetzt gut im Mikroskop beobachtet werden.

Im Holz beider Muira puama-Arten war kein Lupeol nachweisbar, es erfolgte mit dem Reagens nur eine intensive Gelbfärbung. Eine für Lupeol charakteristische Rotfärbung war nicht zu sehen.

Bei der Untersuchung der Rinde fanden wir dagegen in beiden Arten durch Reaktion des Lupeols mit Chlorsulfonsäure rotgefärbte Zellen. Dabei wurde Droge E ungleich intensiver angefärbt als

---

34) C.H. BRIESKORN u. L. SCHLUMPRECHT, Pharmac. Acta Helvetiae, 28, 139 (1953).

Droge A. Die Färbung erfolgte bei beiden Drogen vorwiegend in der primären Rinde und nahm ins Innere der Pflanze rasch ab.

Bei Droge E färbte sich die schwarzbraune Korkschicht nur wenig rot an. Die in der primären Rindenschicht befindlichen zahlreichen Harzzellen mit gelbem bis rotbraunem Inhalt, deren Wände teilweise verdickt waren, zeigten aber eine sehr intensive Bildung der roten Farbe, deren Entwicklung unter dem Mikroskop gut zu erkennen war. Ebenfalls vorhandene zahlreiche Steinzellen wurden nur gelb angefärbt. In Droge E befand sich also Lupeol vorwiegend in den Harzzellen der primären Rinde.

Bei der Untersuchung der Droge A, deren Korkschicht hellgrau bis braun gefärbt war, fanden wir auch in der primären Rinde Harzzellen mit gelbbraunem Inhalt. Diese behielten jedoch bei der Farbreaktion überraschenderweise ihre Farbe. Stattdessen wiesen die Wände der zahlreichen Steinzellen und die Bastfasern der primären Rinde eine Rotfärbung auf.

An der Intensität der Färbung beider Drogen mit dem Reagens war schon der Unterschied des Lupeolgehaltes erkennbar.

Die mikrochemische Untersuchung der Drogen A und E ergab, daß sich Lupeol bei beiden Arten vorwiegend in der primären Rinde befand, während es im Holz selbst nicht nachweisbar war. In Bezug auf den Lupeolgehalt ist die in letzter Zeit vorwiegend im Handel erhältliche Droge Ptychopetalum uncinatum abzulehnen, da sie nur etwa 1/10 der in Ptychopetalum olacoides vorhandenen Triterpenmenge enthält.

Zusammenfassung

Der von AUTERHOFF und PANKOW beschriebene und als "Substanz c" bezeichnete lipophile Hauptinhaltsstoff des Petrolätherextraktes der brasilianischen Droge Lignum Muira puama, der in der Droge in freier und veresterter Form enthalten ist, wurde nach modifizierter Isolierung durch Chromatographie über Aluminiumoxid, Bildung des Benzoates und dessen Hydrolyse in reiner Form erhalten. Da Farbreaktionen und Schmelzpunkte verschiedener Derivate auf eine eventuelle Identität mit dem pentacyclischen Triterpen Lupeol hinwiesen, wurde "Substanz c" mit aus Latex Bresk isoliertem Lupeol verglichen. IR-, NMR- und Massenspektren zeigten Übereinstimmung beider Alkohole und ihrer Derivate, wodurch die Identität der "Substanz c" aus Muira puama mit Lupeol bewiesen ist.

Zur quantitativen Bestimmung von Lupeol in Muira puama wurde eine photometrische Methode ausgearbeitet. Als geeignet erwies sich die für Triterpene spezifische Chlorsulfonsäurereaktion, die mit Lupeol eine stabile rotviolette Färbung mit Maximum bei 535 nm ergibt. Die Bedingungen der Reaktion wurden systematisch variiert. Die für Lupeol als Substanz ausgearbeitete Methode gab Werte, die um ± 2 % schwankten.
Für die Bestimmung von Lupeol in der Droge wurden Extraktion und Hydrolyse der extrahierten Ester untersucht: Zur Extraktion war Chloroform am besten geeignet, zur Verseifung erwies sich 10 %ige Kalilauge als günstig. Bei einer lupeolreichen Droge lag die Fehlergrenze bei ± 5 %. Für die Bestimmung einer lupeolarmen Droge mußte ein Korrekturfaktor berücksichtigt werden, wodurch die Fehlergrenze bis ± 10 % anstieg.

Bei der Untersuchung von 7 Drogenmustern wurde gefunden, daß die Lupeolwerte bei 6 Drogen etwa 20 mg/100 g Droge und bei einer Droge etwa 270 mg/100 g Droge betrugen.

Auf Grund des unterschiedlichen Lupeolgehaltes wurde vermutet, daß eventuell eine Konkurrenzreaktion bei der biogenetischen Bildung von Triterpenen und Sterinen möglich wäre. Daher wurde auf der Grundlage der Liebermann-Burchard-Reaktion eine Gehaltsbestimmung für das in Muira puama enthaltene ß-Sitosterin ausgearbeitet, bei der Lupeol nicht erfaßt wurde. Der ß-Sitosteringehalt, der in allen Drogen konstant bei etwa 60 mg/100 g Droge lag, ließ keinen Zusammenhang mit dem Lupeolgehalt erkennen.

Es wurde die mögliche Beeinflussung des Lupeolgehaltes durch Pilze, die Triterpene synthetisieren können, diskutiert. In den aus Muira puama isolierten und gezüchteten Pilzkulturen war kein Lupeol nachweisbar. Basidiomyceten oder Ascomyceten, die Triterpene zu bilden vermögen, konnten aus dem Drogenmaterial nicht isoliert werden.

Der stark differierende Lupeolgehalt wurde auf Unterschiede im Drogenmaterial zurückgeführt. Auf Grund der dunkleren Rindenfärbung war es wahrscheinlich, daß Ptychopetalum olacoides die Stammpflanze der lupeolreichen Droge ist, die früher allein als Muira puama im Handel gewesen sein soll. Ptychopetalum uncinatum ist wohl die Stammpflanze der untersuchten lupeolarmen Drogen. Die mikrochemische Untersuchung ergab, daß für den Lupeolgehalt der Droge nur der Aufbau der Rinde entscheidend ist, da vorwiegend in der primären Rinde, nicht aber im Holz, Lupeol nachgewiesen werden kann.

Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Reichert Heiztischmikroskop nach Kofler bestimmt. Sie sind unkorrigiert angegeben.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden mit einem Heraeus-Mikro-R-Verbrennungsgerät durchgeführt.

Ultraviolett-Absorptionsspektroskopie

Die Messungen erfolgten mit einem Beckman DB Spektralphotometer und mit einem Zeiss Spektralphotometer PMQ II in Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke.

Infrarot-Absorptionsspektroskopie

Die Spektren wurden in einem Beckman-Spektrophotometer IR-8 in KBr-Preßlingen oder CCl_4-Lösung aufgenommen.

Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte in einem Varian A 60-Gerät mit Deuterochloroform als Lösungsmittel. Als Referenzsignal diente Tetramethylsilan.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden in einem AEI-Gerät Typ MS 9 bei 70 eV aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

Die DC-Analysen wurden mit der Desaga-Grundausrüstung auf Trägerplatten der Größe 20 x 20 cm durchgeführt. Sorptionsmittel: Kieselgel HF 254 "Merck". Aktivierung der beschichteten Platten

1 Std. bei 110°. Die Zusammensetzung der Fließmittel ist in Volumenteilen bei den Abbildungen angegeben. Die Sichtbarmachung erfolgte durch Betrachten im UV-Licht und durch Besprühen mit folgenden Reagenzien:

a) Antimon(III)-chlorid-Sprühmittel nach KAUFMANN und GUPTA:

20 g Antimon(III)-chlorid wurden in einem Gemisch aus 20 ml Eisessig und 60 ml Chloroform gelöst. Die Nachbehandlung der besprühten Platten erfolgte durch Erhitzen für 10 min auf 100°.

b) Chlorsulfonsäure-Sprühreagens:

Zu 60 ml Eisessig wurden unter Wasserkühlung langsam 30 ml reine Chlorsulfonsäure "Riedel de Haen" gegeben. Die besprühten Platten wurden 5 min auf 130° erhitzt.

Steroid-Farbreaktionen

a) Salkowski-Reaktion

Etwas Substanz wurde in Chloroform gelöst, und die Lösung mit konz. Schwefelsäure unterschichtet. Steroide sollen einen roten Ring an der Grenzfläche bilden bzw. Rotfärbung der Phasen beim Umschütteln.

b) Liebermann-Burchard-Reaktion

5 mg der Substanz wurden in 3 ml Chloroform gelöst und mit 2 ml eines Reagenzes versetzt, das aus 2 T. konz. H_2SO_4 und 10 T. Acetanhydrid bestand. Bei positivem Ausfall bilden Steroide über die Farbskala Rot-Violett-Blau rasch eine intensive Grünfärbung.

Spezifische Farbreaktionen für pentacyclische Triterpene

a) Reaktion mit 2,6-Di-tert.butyl-p-kresol

5 mg des Triterpens wurden in 1 ml Äthanol heiß gelöst und mit 0,5 ml einer 1 %igen äthanolischen Lösung des Reagenzes und 1 ml 20 %ige wäßrige Natronlauge versetzt. Die Mischung wurde 30 min im Wasserbad ohne Rückfluß erhitzt, wobei der Alkohol abdestillierte. Bei Triterpenen soll ein blauvioletter Niederschlag

zurückbleiben, der sich in neutralem Aceton mit gleicher Farbe löst.

b) Reaktion mit Chlorsulfonsäure-Eisessig-Reagens

2 mg des Triterpens wurden in wenig Chloroform gelöst und mit 3 ml einer Chlorsulfonsäure-Eisessig-Mischung (1 : 3) versetzt, wobei sich bei positivem Ausfall der Reaktion innerhalb weniger Minuten eine intensive Rotfärbung entwickeln muß.

Farbreaktion auf Lupeol nach LIKIERNIK

10 mg Lupeol wurden in 5 ml Chloroform gelöst und mit 10 Tropfen Acetanhydrid versetzt. Nach Zugabe von 2 Tropfen konz. H_2SO_4 soll sich allmählich eine Rotfärbung entwickeln, die innerhalb einer halben Stunde in ein intensives Violett übergeht.

Gewinnung des Petrolätherextraktes von Muira puama

500,o g grob gepulverte Droge wurden 14 Tage lang kontinuierlich in einer Soxhletapparatur mit Petroläther (50 - 70°) extrahiert. Die gelbe Petrolätherlösung wurde filtriert, und das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft. Der gelbbraune Rückstand wurde 2 Tage über $CaCl_2$ getrocknet und gewogen.
Ausbeute: 0,5 bis 3,0 g Extrakt (= 0,1 - 0,6 %, ber. auf die Droge).

Gewinnung von Substanz c

a) Verseifung und Chromatographie:
10,o g Extrakt wurden ohne vorheriges Umkristallisieren mit 250 ml 10 %iger äthanolischer Kalilauge ungefähr 36 Std. in der Siedehitze unter ständigem Rühren verseift. Nach Entfernen des Alkohols i. Vak. wurde der Rückstand in wenig Benzol gelöst und auf eine Säule von neutralem Al_2O_3 nach Brockmann unter Elution mit Benzol gegeben (Säule: d = 2 cm, l = 45 cm). Die ersten 500 ml Eluat wurden aufgefangen, und der Rückstand nach Abdampfen des Benzols i. Vak. weiterverarbeitet.

b) Digitoninfällung:

Der von fettsauren Alkalisalzen befreite Rückstand wurde heiß in 100 ml 95 %igem Äthanol gelöst und bei 60° mit 50 ml einer ebenso warmen Digitoninlösung (0,5 g in 50 ml 90 %igem Äthanol) versetzt. Die Mischung wurde noch 1/4 Std. bei 60° belassen und über Nacht stehen gelassen. Der weiße voluminöse Niederschlag des Digitonids wurde abgesaugt und gründlich mit Äther nachgewaschen, um zum Teil ausgefallene Substanz c, die in kaltem Äthanol schwer löslich ist, herauszulösen. Nach Prüfung auf Vollständigkeit der Digitoninfällung wurden Alkohol und Äther weitgehend i. Vak. entfernt, und der Rückstand mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, da Substanz c im Gegensatz zu ihrer veresterten Form in Äther leicht löslich war. Die ätherische Lösung wurde eingeengt, und der Rückstand mehrmals mit Äther umgelöst, um restliches Digitonin zu entfernen.

c) Darstellung des Benzoates:

Ungefähr 5,o g des Rückstandes, der vorwiegend aus verunreinigter Substanz c bestand, wurde in 10 ml Benzol heiß gelöst und unter Zusatz von je 10 ml Benzoylchlorid und frisch destilliertem, wasserfreiem Pyridin etwa 2 Std. im siedenden Wasserbad unter Rückfluß erwärmt. Die Mischung wurde in eine Porzellanschale gegossen und noch etwa 4 Std. auf dem Wasserbad erhitzt. Wir erhielten ein dunkelbraunes, schmieriges Gemisch, das nach dem Abkühlen mit 20 ml n H_2SO_4 verrieben, filtriert und mit Wasser bis zur neutralen Reaktion nachgewaschen wurde.

Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton konnten jetzt die braunen Verunreinigungen des Benzoates sehr leicht entfernt werden, die die Darstellung des reinen Alkohols direkt aus dem Drogenextrakt verhindert hatten. Schmp. des Benzoates (aus Aceton): 256 - 259°.

d) Verseifung des Benzoates:

1,o g des reinen Benzoates wurde mit 5 g KOH und 30 ml 90 %igem Äthanol in der Siedehitze unter ständigem Rühren 3 Std. lang

verseift. Beim Erkalten der Mischung kristallisierte Natriumbenzoat aus. Der größte Teil des Alkohols wurde entfernt, die Mischung mit etwa der fünffachen Menge Wasser verdünnt, und die ausgefallene Substanz c mehrmals mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde mit Wasser neutral gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.
Nach Umkristallisation aus Methanol erhielten wir große, seidig glänzende Nadeln, die zum Teil in Büscheln vereinigt waren. Sie wurden über P_2O_5 bei 60° getrocknet.
Schmp. der reinen Substanz c: 213 - 215°.

Gewinnung von Lupeol:

50,o g grob zerschnittener Bresk wurde mit etwa 1 l 70 %igem Äthanol in einer Soxhletapparatur 8 Std. lang extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde die ausgefallene weiße Substanz abfiltriert und anschließend 36 Std. unter ständigem Rühren in der Siedehitze mit 200 ml 10 %iger äthanolischer Kalilauge verseift. Nach Entfernen des größten Teiles an Äthanol wurde die Mischung in etwa die fünffache Menge Wasser gegossen,und die Fällung nach 24 Std. abgesaugt. Die ätherische Lösung dieser Fällung wurde mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Nach Aufarbeitung der Ätherlösung wurde der gelbliche Rückstand (9,6 g) 12 Std. über P_2O_5 getrocknet. Der Schmelzpunkt des Gemisches lag bei 135 - 155°.
Dieses Gemisch wurde wie bei Substanz c beschrieben nach Lösen in wenig Benzol mit Benzoylchlorid in Gegenwart von wasserfreiem Pyridin benzoyliert. Die vollständige Abtrennung der Isomere α- und ß-Amyrinbenzoat von Lupeolbenzoat war langwierig. Sie wurde auf Grund der leichteren Löslichkeit der Amyrine in einem Benzol/Aceton-Gemisch erst nach achtmaliger Umkristallisation erreicht. Dazu wurden die Benzoate zunächst in möglichst wenig Benzol heiß gelöst und dann mit so viel Aceton versetzt, bis eine feine Trübung entstand.
Ausbeute: 2,7 g Lupeolbenzoat
Schmp.: 256 - 259°

Elementaranalysen

Substanz c	Gef.: C 85,09	H 12,08	O 2,82
Lupeol	Gef.: C 82,70	H 12,1	O 5,2
$C_{30}H_{50}O$	Ber.: C 84,44	H 11,81	O 3,75
$C_{30}H_{50}O \cdot 1/2\ H_2O$	Ber.: C 82,69	H 11,8	O 5,5

Die Umkristallisation von Substanz c aus Methanol erfolgte wesentlich langsamer als bei Lupeol, weshalb die gefundenen Werte für Substanz c eher mit der berechneten Formel $C_{30}H_{50}O$ übereinstimmen, während die für Lupeol gefundenen Werte $C_{30}H_{50}O$ mit 1/2 Molekül Kristallwasser entsprechen.

Substanz c-Benzoat	Gef.: C 82,13	H 9,63	O 8,24
Lupeol-Benzoat	Gef.: C 82,13	H 10,82	O 7,05
$C_{37}H_{54}O_2 \cdot 1/2\ H_2O$	Ber.: C 82,32	H 10,27	O 7,41

Hydrierung von Substanz c

100 mg reine Substanz c wurden in ca. 50 ml Eisessig gelöst und unter Zugabe von 100 mg Platin (IV)-oxid in einer Schüttelente bei 60° hydriert. Nach etwa 1/2 Std. wurde kein Wasserstoff mehr aufgenommen. Der Katalysator wurde nach dem Erkalten abfiltriert, die Lösung mit Wasser verdünnt, und die hydrierte Substanz mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde mit $NaHCO_3$-Lösung und anschließend mit Wasser neutral gewaschen, dann mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Nach Umkristallisation aus Methanol wurden 87 mg hydrierte Substanz c in Form kleiner Kristallnadeln erhalten.
Schmp.: 188 - 190°

Darstellung von Dihydrolupeol

Die Hydrierung des Lupeols erfolgte auf die gleiche Weise, wie bei Substanz c beschrieben, mit PtO_2 als Katalysator. Das mit

Äther extrahierte Produkt wurde aus Methanol umkristallisiert. Schmp.: 188 - 190°

Quantitative Bestimmung von Lupeol in Muira puama

Extraktion der Droge:

10,o g fein gepulvertes Lignum Muira puama wurden mit je 100 ml Petroläther (50 - 70°), Chloroform, Benzol und 96 %igem Äthanol extrahiert. Nach dem Abfiltrieren wurde der Drogenrückstand 1/2 Std. mit dem gleichen Lösungsmittel extrahiert, das Filtrat mit dem ersten Auszug vereinigt und zur Trockne eingedampft. Die Extraktmenge war je nach Droge verschieden.
Wir erhielten für eine Droge, die mit den verschiedenen Lösungsmitteln ausgezogen wurde, folgende Werte:

Petroläther: 43,3 mg

Chloroform : 119,7 mg

Benzol : 57,6 mg

Äthanol : 95,5 mg

Da die Extraktion mit Chloroform quantitativ und am schnellsten vonstatten ging, wurde nur noch diese bei der Behandlung der verschiedenen Drogenlieferungen eingesetzt. Zur Extraktion mit Chloroform kann auch die Schnittdroge an Stelle der Pulverdroge verwendet werden.

Hydrolyse des Esters

Der gelbbraune Extrakt wurde nach völligem Entfernen des Chloroforms mit einer Lösung von 2 g KOH p. a. in 20 ml 90 %igem Äthanol versetzt und in der Siedehitze unter ständigem Rühren 2 Std. lang verseift. Nach Entfernen des größten Teils an Äthanol wurde die Mischung mit 50 ml Wasser verdünnt und viermal mit je 30 ml Äther ausgeschüttelt. Die auf ein Volumen von ca. 50 ml eingeengte ätherische Lösung wurde so lange mit je 25 ml Wasser gewaschen, bis Phenolphthaleinlösung nicht mehr gerötet wurde.

Die gelbe Ätherlösung wurde nach Einengen in ein 10 ml-Meßkölbchen gebracht und bis zur Marke mit Äther aufgefüllt.

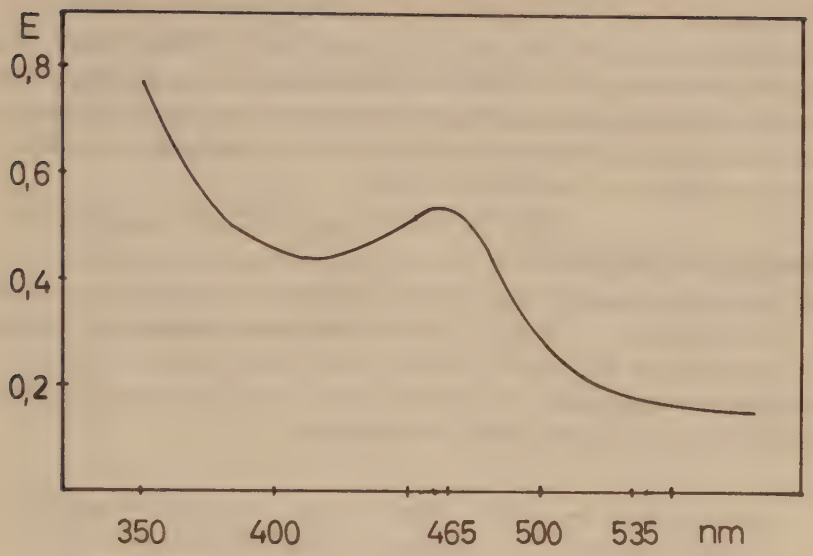
Ausführung der Farbreaktion

2,5 ml dieser Ätherlösung (entsprechend 2,5 g Droge) wurden zunächst für die Bestimmung nach Entfernen des Äthers verwendet. Der Rückstand wurde in einem 10 ml-Meßkölbchen mit 2,o ml Chloroform p. a. gelöst und mit 5,o ml des Chlorsulfonsäurereagenzes versetzt. Gleichzeitig wurde eine Blindlösung, bestehend aus 2,o ml Chloroform und 5,o ml des Reagenzes, angesetzt. Beide Mischungen wurden im Wasserbad bei konstant 40° 15 min lang erwärmt, wobei die Meßkolben zu 2/3 in die Flüssigkeit eintauchten. Nach Abkühlen unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur wurde mit Eisessig p. a. auf 10,o ml aufgefüllt, und die Farblösung nach 3 Std. bei 535 nm im Zeiss-Photometer in Küvetten von 10 mm Schichtdicke bei 20° gemessen.

Bei geringem Lupeolgehalt der Droge wurde die Nullinie entsprechend der in 2,5 g lupeolfreier Droge gefundenen Nullinie korrigiert, und gemäß der Eichkurve die Lupeolmenge bestimmt. Lag die Extinktion bei Ausführung der Farbreaktion mit 2,5 g des Ätherextraktes über 0,65, so mußte die Bestimmung nochmals mit einer geringeren Menge des Ätherextraktes durchgeführt werden. Bei einer geringeren Ausgangsmenge mußte aber auch der Wert der Nullinie entsprechend korrigiert werden.

Korrektur der Nullinie

Bei Ausführung der Farbreaktion mit 2,5 ml Ätherextrakt, entsprechend 2,5 g Droge, in der dc kein Lupeol nachweisbar war, wurde durch in der Droge enthaltene gelbe Begleitstoffe die Nullinie bei 535 nm erhöht (Abb.), so daß der Mittelwert bei der Bestimmung von 2,5 g dieser lupeolfreien Drogen zur Korrektur der Nullinie eingesetzt werden mußte. Dieser Korrekturfaktor mußte nur bei der Gehaltsbestimmung lupeolarmer Drogen berücksichtigt werden, für deren quantitativer Analyse mindestens 2,5 g Droge verwendet werden mußten.



Chlorsulfonsäurereaktion mit 2,5 g lupeolfreier Droge.

Ermittlung des Fehlers bei Verwendung von Aktivkohle zur Korrektur der Nullinie

1 mg Lupeol wurde in 25 ml Äther gelöst und unter Zusatz von 0,1 g Aktivkohle geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Adsorbens wurde die Chlorsulfonsäurereaktion wie üblich durchgeführt:

Extinktion 535 nm	Abweichung vom Mittelwert
0,312	+ 0,013
0,300	+ 0,001
0,285	- 0,006

Mittelwert: 0,299 $\pm$ 0,0066

Der Mittelwert bei der Bestimmung von 1 mg Lupeol betrug 0,351, der Verlust beim Arbeiten mit 0,1 g Aktivkohle, einer Menge, die nur zur teilweisen Entfärbung des Ätherextraktes ausreicht, lag bei 15 - 20 %. Um störende Begleitstoffe aus dem Ätherextrakt zu entfernen, war die Methode mit Aktivkohle ungeeignet, da auch Lupeol beträchtlich adsorbiert wurde.

Aufstellen der Eichkurve:

12,5 mg reines Lupeol wurden in 25 ml Chloroform gelöst. Von dieser Lösung wurden 1 - 4 ml in 10 ml-Meßkolben pipettiert, der Inhalt zur Trockne eingeengt, und der Rückstand wieder in je 2 ml Chloroform aufgenommen. Nach Zugabe von 5,o ml Chlorsulfonsäurereagens wurde wie vorher weitergearbeitet.

Einwaage mg	Extinktion 535 nm (Mittelwerte)
0,5	0,178
1,o	0,351
1,5	0,489
2,o	0,652

Reagenzien:

a) Chlorsulfonsäure-Reagens: In 80 Teile Eisessig p. a. werden langsam unter Kühlung 20 Teile reine Chlorsulfonsäure "Riedel de Haen" gegossen. Für eine Bestimmung werden 5,o ml der klaren, farblosen Lösung verwendet. Das Reagens muß jeden Tag frisch bereitet werden.

b) Eisessig p. a.

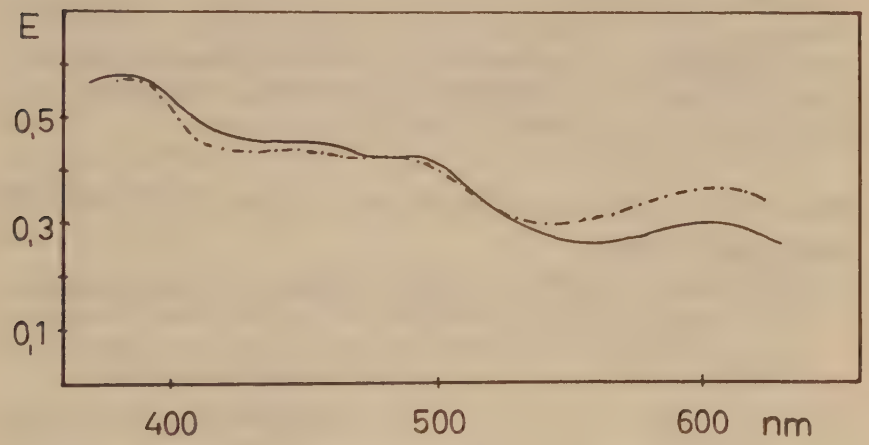
c) Chloroform p. a.

d) Alkoholische Kalilauge: 2,o g Kaliumhydroxid werden in 20 ml 90 %igem Äthanol gelöst.

e) Blindlösung: 2 ml Chloroform werden mit 5,o ml des Chlorsulfonsäurereagenzes versetzt und entsprechend der Lupeollösung weiterverarbeitet.

Chlorsulfonsäurereaktion mit ß-Sitosterin

Bei Ausführung der Farbreaktion mit 5 mg ß-Sitosterin wurde erst eine instabile blauviolette Färbung erhalten, die nach 1 Std. in Grün übergegangen war (s.Abb.).



Chlorsulfonsäurereaktion mit 5 mg ß-Sitosterin

———— nach 15 min

-.-.-.- nach 1 Std.

Bei 535 nm wies ß-Sitosterin ein Minimum auf. Außerdem lag die Empfindlichkeit von ß-Sitosterin im Vergleich mit Lupeol wesentlich niedriger. Da in den von uns untersuchten Drogen 2,5 g Muira puama höchstens 1 mg ß-Sitosterin enthielten, wird durch das Sterin keine Störung der quantitativen Bestimmung hervorge-

rufen.

Chlorsulfonsäurereaktion mit veresterter Substanz c aus Muira puama und Lupeolbenzoat

	Extinktion 535 nm
3,525 mg veresterte Substanz c	0,254
2,5 mg Lupeolbenzoat	0,261

Zur Ausführung der Chlorsulfonsäurereaktion wurde die 2 mg Lupeol entsprechende Menge der veresterten Substanzen eingewogen (Mol.-Gew. von veresterter Substanz c: 752; Mol.-Gew. von Lupeolbenzoat: 531). Die Maxima beider Substanzen lagen relativ dicht beieinander. Während mit 2 mg Lupeol eine Extinktion von 0,652 zu erwarten ist, erhielten wir mit beiden Estern nur eine Extinktion, die bei 40 % des freien Alkohols lag.

Ermittlung des Fehlers bei Zugabe verschiedener Lupeolmengen zur lupeolfreien Droge

a) 10,o g Droge wurden 2,5 mg Lupeol zugemischt. Das entspricht in 2,5 g Droge 0,625 mg:

Extinktion 535 nm	Extinktion nach Korrektur
0,369	0,183
0,367	0,181
0,379	0,193

Mittelwert: 0,371 = 0,525 mg Lupeol
Dies entspricht 82 % der beigemischten Menge an Lupeol.

b) 10,o g Droge wurden 5,1 mg Lupeol zugemischt. Dies entspricht in 2,5 g Droge 1,27 mg Lupeol.

Extinktion 535 nm	Extinktion nach Korrektur
0,603	0,418
0,598	0,413
0,632	0,447

Mittelwert: 0,425 = 1,275 mg Lupeol.

Es wurden 100 % der zugemischten Menge wiedergefunden.

Quantitative Bestimmung von ß-Sitosterin in Muira puama

Extraktion und Hydrolyse

10,o g der Droge wurden wie bei der Lupeolbestimmung mit Chloroform extrahiert und mit 10 %iger ätanolischer Kalilauge verseift. Der Ätherextrakt der alkalischen Lösung wurde im Meßkolben zu 10 ml aufgefüllt und zur Bestimmung verwendet.

Reagenzien

a) Acetanhydrid-Schwefelsäure-Reagens: Zu 20 ml Acetanhydrid p. a. wurden unter Wasserkühlung langsam 2 ml konz. Schwefelsäure p. a. gegeben, und für eine Bestimmung 1 ml der klaren, farblosen Lösung verwendet. Das Reagens muß jeden Tag frisch bereitet werden.

b) Chloroform p. a.

c) Blindlösung: 4,o ml Chloroform wurden mit 1,o ml des H_2SO_4-Acetanhydridgemisches unter ständiger Wasserkühlung gemischt und entsprechend der ß-Sitosterinlösung weiterbehandelt.

Ausführung der Farbreaktion

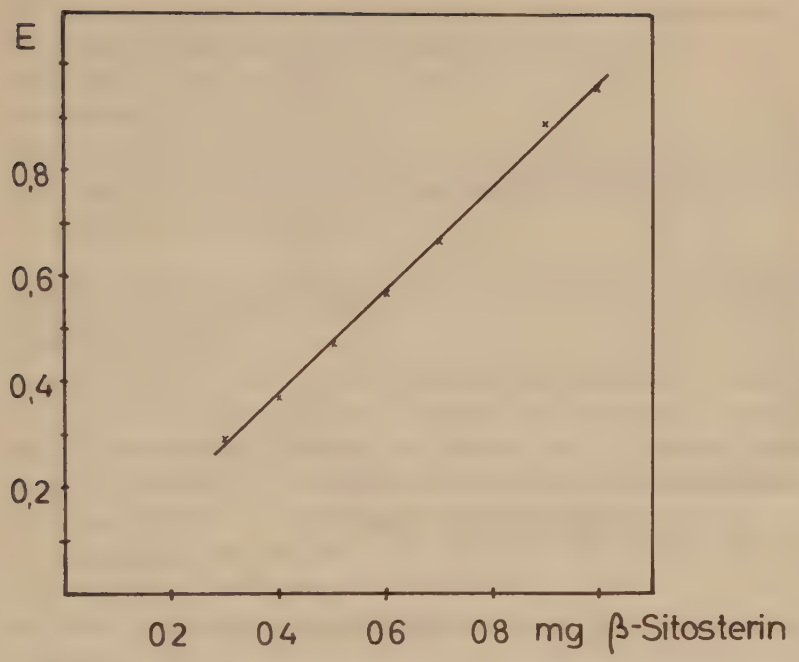
2,5 ml der Ätherlösung, entsprechend 2,5 g Droge, wurden nach Entfernung des Äthers zur Bestimmung verwendet. Der Rückstand wurde zunächst in 4,o ml Chloroform gelöst und 1,o ml des auf 20° temperierten Reagenzgemisches unter Wasserkühlung und Umschwenken zugefügt. Gleichzeitig wurde eine Blindlösung aus 4,o ml Chloroform und 1,o ml Reagens bereitet. Die Messung der entstandenen Grünfärbung wurde gegen die Blindlösung nach 25 min in 1 cm-Küvetten bei 20° durchgeführt. Der Vergleich der bei 668 nm gemessenen Extinktion mit der Eichkurve von ß-Sitosterin ergab den Gehalt von ß-Sitosterin in der Droge.

Eichkurve

5,o mg ß-Sitosterin, das 25 % Campesterin enthielt, wurden in 20 ml Chloroform gelöst. Von dieser Lösung wurden 1,2 bis 4,o ml in 10 ml-Meßkolben pipettiert, auf 4,o ml mit Chloroform ergänzt und nach Zugabe von 1,o ml des Säuregemisches wie vorher weiterbehandelt.

Einwaage mg	Extinktion 668 nm nach 25 min
0,3	0,290
0,4	0,371
0,5	0,470
0,6	0,572
0,7	0,666
0,9	0,890
1,0	0,960

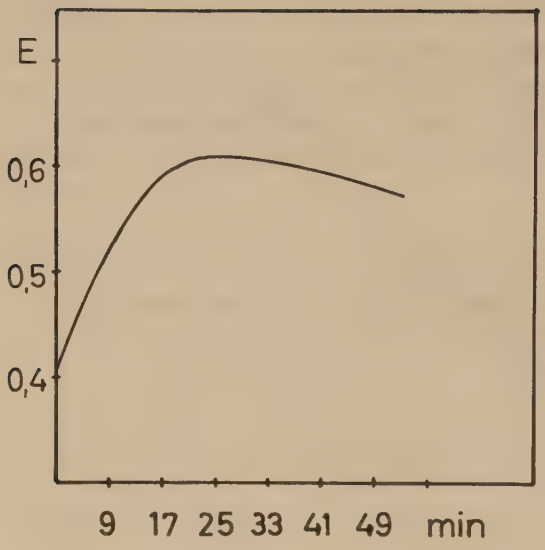
Mit 0,5 mg ß-Sitosterin auf 5 ml Reagens erhält man eine Extinktion von 0,47, was $E^{1\%}_{1cm} = 47$ und damit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 1950 entspricht (Mol.-Gew. von ß-Sitosterin: 415). Die LBR ist also hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit für ß-Sitosterin mit der Chlorsulfonsäurereaktion für Lupeol (molarer Extinktionskoeffizient: 1493) vergleichbar. Dies wirkt sich ebenfalls günstig für die ß-Sitosterinbestimmung in Muira puama neben der Lupeolbestimmung im gleichen Ätherextrakt aus.



Eichkurve von ß-Sitosterin

Stabilitätsmessung

Bei der Messung der Stabilität in Abhängigkeit von der Zeit mit in Muira puama enthaltenem ß-Sitosterin stieg die Extinktion der Farblösung anfangs steil an. Nach 25 min war das Maximum der Extinktion bei 668 nm erreicht, der Abfall erfolgte nur langsam, so daß die Messungen nach 25 bis 28 min mit genügender Genauigkeit durchgeführt werden konnten.



Stabilitätskurve von 0,6 mg ß-Sitosterin bei 668 nm

Fehlerrechnung bei der Bestimmung von ß-Sitosterin in Droge A

Einwaage	Extinktion 668 nm	% ß-Sitosterin	Abweichung vom Mittelw.
2,5 ml = 2,5 g Droge	0,649	0,027	+ 0,001
	0,575	0,024	- 0,002
	0,655	0,028	+ 0,002

Mittelwert: 0,026
Mittlerer Fehler des Mittelwertes F_m: 0,002
Wahrscheinl. Fehler des Mittelwertes F_w: 0,0013
Endergebnis E_w: 0,026 $\pm$ 0,0013 %

Die Fehlergrenze der Bestimmung von ß-Sitosterin in Droge A liegt bei 5 %, entsprechend einem Unterschied im Gehalt von 100 g Droge von 1,3 mg ß-Sitosterin.

Ermittlung des Fehlers bei Zugabe einer bekannten ß-Sitosterinmenge zur Droge A

10,o g Droge wurden 2,03 mg ß-Sitosterin zugemischt und wie üblich extrahiert und verseift. Für die Farbreaktion wurden wegen der zu erwartenden erhöhten Extinktion nur 2,o ml des Ätherextraktes eingesetzt. Die Extinktion sollte bei 0,903 liegen, entsprechend 0,934 mg ß-Sitosterin in 2 g Droge.
Wir erhielten nach 25 min eine mittlere Extinktion von 0,836. Dies entsprach 0,865 mg ß-Sitosterin.
Bei Zumischung von 2 mg ß-Sitosterin zu 10 g Droge wurden 93,6 % wiedergefunden. Berücksichtigt man die Fehlergrenze der ß-Sitosterinbestimmung von Droge A, so wurden 90 - 100 % der zugefügten ß-Sitosterinmenge wiedergefunden.

Mikrochemische Untersuchung von Muira puama

Von der in Wasser aufgeweichten Droge wurden dünne Querschnitte angefertigt. Diese wurden auf einem Objektträger zur Aufhellung des Präparates mit konz. Chloralhydratlösung kurz aufgekocht, und die Lösung anschließend mit Filtrierpapier abgesaugt. Dann wurden auf die Schnitte 2 bis 3 Trpf. Sesolvan NK gegeben und 1 Trpf. 60 %ige Chlorsulfonsäure in Sesolvan NK zugesetzt. Ein Erwärmen war nicht nötig, da sogleich die beginnende Rotfärbung zu beobachten war.

L e b e n s l a u f

Am 23. September 1943 wurde ich, Birgit Momberger, geb. Wagler, als zweite Tochter des Rechtsanwaltes Dr. Waldemar Wagler und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Woll, in Gießen geboren.

Von 1950 - 1953 besuchte ich die Volksschule in Gießen und wechselte dann auf das humanistische Gymnasium am selben Ort über, wo ich im Februar 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Nach je einjähriger Praktikantenzeit in der Apotheke der Universitätskliniken und der Engel-Apotheke in Gießen bestand ich im März 1965 die Pharmazeutische Vorprüfung in Darmstadt.

Das Pharmaziestudium begann ich im Wintersemester 1965/66 an der Universität in Tübingen und beendete es dort mit dem Pharmazeutischen Staatsexamen im Oktober 1968.

Nach einer viermonatigen Kandidatenzeit in der Steinschen Apotheke in Hofheim begann ich im Mai 1969 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff im Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen mit der Dissertation "Der lipophile Inhaltsstoff von Muira puama", die ich im Oktober 1970 abschloß.

Ab Oktober 1969 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

Am 12. September 1969 heiratete ich Herrn Apotheker Helmut Momberger.

Meine akademischen Lehrer waren - außer Herrn Professor Dr. H. Auterhoff - die Damen und Herren Professoren und Dozenten: E. Graf, H. Möhrle, F. Moll (Pharmazie); M. Hanack, E. Müller, W. Rüdorff (Chemie); E. Bünning, A. Grahle, K. Mägdefrau (Botanik); K. Hummel, E. Reinhard (Pharmakognosie); R.E. Bader (Hygiene); F. Lembeck, H. Uehlecke (Pharmakologie); H. Krüger (Physik).